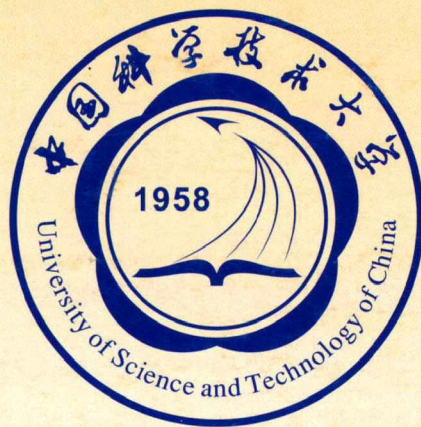


中国科学技术大学

University of Science and Technology of China

# 博士学位论文



论文题目 光镊研究 rpoS RNA 自抑制茎环

作者姓名 呼新尧

学科专业 物理学

导师姓名 郭光灿 教授 李银妹 教授

完成时间 二〇一九年五月

# 中国科学技术大学

# 博士学位论文



## 光镊研究 *rpoS* RNA 自抑制茎环结构

作者姓名：呼新尧

学科专业：物理学

导师姓名：郭光灿 教授 李银妹 教授

完成时间：二〇一九年五月九日

University of Science and Technology of China  
A dissertation for doctor's degree



# Optical Tweezers Studies of rpoS mRNA Inhibitory Stem Structure

Author: Xinyao Hu

Speciality: Physics

Supervisors: Prof. Guang-Can Guo, Prof. Yin-mei Li

Finished time: May 9<sup>th</sup>, 2019

## 中国科学技术大学学位论文原创性声明

本人声明所呈交的学位论文,是本人在导师指导下进行研究工作所取得的成果。除已特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含任何他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的贡献均已在论文中作了明确的说明。

作者签名: 李新亮

签字日期: 2019.6.3

## 中国科学技术大学学位论文授权使用声明

作为申请学位的条件之一,学位论文著作权拥有者授权中国科学技术大学拥有学位论文的部分使用权,即:学校有权按有关规定向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版,允许论文被查阅和借阅,可以将学位论文编入《中国学位论文全文数据库》等有关数据库进行检索,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人提交的电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

公开 保密(\_\_\_\_年)

作者签名: 李新亮

导师签名: 李银峰

签字日期: 2019.6.3

签字日期: 2019.6.3

## 摘要

生物大分子的结构及其动态变化是一切生命现象的物质基础。在分子水平上对生物大分子结构与功能进行研究,阐释生命现象的本质,对人类认知世界与自身都有重大意义。本论文系统地调研光镊技术研究单分子的不同实验方案,并针对多种分子生物学体系进行研究,在前人基础上提出本研究的实验方法和实验方案。取得主要研究成果如下:

1. 建立高精度、高稳定的光镊拉伸单分子实验装置。光镊对位移及外力的测量精度与系统的稳定性决定了适合研究的体系。为了提高原光镊系统的稳定性,本研究采取引入探测光以提高测量精度;利用对粘底微球的图像识别,实现反馈补偿系统漂移等多项措施,创造优良的系统稳定性。为顺利完成单分子测量,我们发展了单分子样品的制备、分子偶联等技术。

2. 研究 *rpoS* RNA 自抑制茎环结构。本文利用光镊对 *rpoS* RNA 的自抑制茎环进行拉伸得到了稳定重复的 RNA “力-伸展”曲线。通过对 RNA “力-伸展”曲线的分析,得到 *rpoS* RNA 自抑制茎环结构被打开的动力学过程,证实其 three-way-junction 结构,计算了 RNA 关键核心部分的自由能。实验发现镁离子明显提高了自抑制茎环核心部分的结合强度,由此推测镁离子会促使 RNA 结构变得更加紧密并改变茎环的空间取向。这一结构变化客观上拉近了 D1 和 D2 茎环之间的距离,方便 Hfq 蛋白帮助 sRNA 结合在 SD 区域上,从而解除基因表达的自抑制。

3. 研究 GSK、Syntelin 抑制 CENP-E 行走机理。光镊研究 CENP-E 行走的动力学特性,发现其平均运动速度低于 kinesin-1 蛋白,行走一段距离后会“休息”片刻。实验结果表明 GSK 阻断了 CENP-E 行走时 ATP 水解为 ADP 的过程,从而实现对 CENP-E 行走的抑制。依据实验现象,我们推测 Syntelin 是通过阻碍 CENP-E·ADP 从微管上解离,从而抑制了 CENP-E 运动。

4. 研究 CENP-T 与 CENP-W 蛋白间相互作用强度。本文提出了一种将 CENP-T 或 CENP-W 连接在 DNA 手柄一端,再通过手柄另一端偶联在微球上的方案。通过这一策略我们测量了 CENP-T/W 之间的断裂力,直接从单分子水平上研究磷酸化对 CENP-T/W 蛋白结合强度的影响。

5. 为了实现对流动细胞的动态相位成像,本文提出了一种基于单像素的相位成像方法。通过动态加载不同波矢的平面波采集物体的傅里叶频谱,借助逆傅里叶变换对物体的振幅与相位分布进行重构。实验测试了二值化相位分布与

连续相位分布，均得到良好的重构效果。

本文建立了高精度、高稳定性的光镊研究生物单分子力学特性实验平台，并通过一系列生物物理交叉问题的研究证实了这一平台在生命科学领域的价值。研究取得的结果在生命科学基本问题、医学应用等方面都具有一定贡献，为使用光镊进行深入的分子生物学研究奠定了基础。

**关键词：**光镊，RNA 结构，驱动蛋白，小分子抑制剂，蛋白相互作用，复杂光场调制，单像素成像

## ABSTRACT

The conformation and dynamic of biomacromolecules are building blocks of all life phenomena. The study of biomacromolecule structure and function at the single molecular level has great significance in explaining the essence of life phenomenon and improving cognition of the world and mankind . In this thesis, I systematically investigated different optical tweezers strategies of single molecule study, and applied them into different molecular biology systems. The main achievements are as follows:

1. Improvement of stability and measurement accuracy of optical tweezers setup for single molecule stretching. The measurement accuracy of displacement and external force and the stability of the system determine the suitability of the optical tweezers setup. In this work, a detection light is introduced to improve the measurement accuracy, and the microspheres' image recognition is employed to construct a feedback compensation system against mechanical drift. With all these attempts, an optical tweezers setup with excellent stability was obtained. Furthermore , I developed single-molecule sample preparation, biomolecule conjugation technology for the single-molecule measurements.

2. Study of *rpoS* RNA self-inhibition stem-loop conformation. The "force-extension" curve of *rpoS* RNA was obtained by stretching the self-inhibitory stem loop of *rpoS* RNA with optical tweezers. I studied the dynamic unfolding/folding process of *rpoS* RNA self-inhibition stem-loop through "force-extension" curves obtained by optical tweezers, confirmed its three-way-junction structure, and calculated the free energy of the RNA subunits. I found that magnesium ions significantly enhanced the strength of RNA junction and therefore compressed RNA conformation, change the spatial orientation of stem loop. This conformational change objectively shortens the distance between D1 and D2 stem loops, facilitates the sRNA recruited by Hfq protein to bind to the SD region and thereby activate the gene expression.

3. The study on the mechanism of GSK and syntelin inhibiting CENP-E . I characterized the dynamic of CENP-E walking along microtubule with optical tweezers and found the average speed of CENP-E was lower than that of kinesin-1.

Experimental results indicated that GSK blocked ATP hydrolysis and inhibited CENP-E walking. Therefore, I hypothesize that syntelin inhibits CENP-E motion by preventing CENP-E·ADP dissociation from microtubules.

4. The study of interaction between CENP-T and CENP-W protein. In this work, a method of coupling CENP-T or CENP-W to microspheres via DNA handle is presented. Using this strategy, I attempted to measure the breaking force between CENP-T/W and directly study the effect of phosphorylation on the binding strength of CENP-T/W protein at the single molecule level.

5. A single pixel phase imaging method is proposed to realize the dynamic phase imaging of mobile cells in this paper. Based on complex Fourier spectrum of an object which is acquired by dynamically loading plane waves with different wave vectors, and the amplitude and phase distributions of the object are reconstructed by reverse Fourier transform. The binary phase distribution and the continuous phase distribution are tested experimentally, and both of them have good reconstruction results.

In this dissertation, a high-precise and ultra-stable optical tweezers setup for single molecule study was established, and its value in life science has been confirmed through a series of biophysical interdisciplinary projects. The results obtained in this study contributed to the fundamental concerns of life science and medical applications, and established a foundation for further optical tweezers study of molecular biology.

**Key Words:** Optical tweezers, RNA structure, Kinesin, Molecule inhibitor, Protein-protein interaction, Complex light shaping, Single-pixel imaging



目录

第 1 章	绪论.....	1
1.1	单分子光镊技术现状与进展.....	1
1.1.1	单光镊法.....	2
1.1.2	微针-光镊法.....	3
1.1.3	双光镊与多光镊法.....	3
1.1.4	高通量单分子光镊.....	4
1.1.5	荧光光镊.....	4
1.1.6	FRET 光镊.....	5
1.2	光镊研究 DNA.....	6
1.2.1	DNA 过拉伸.....	6
1.2.2	核小体.....	7
1.3	光镊研究 RNA 结构.....	8
1.3.1	光镊研究 RNA 方法.....	9
1.3.2	rpoS RNA.....	10
1.4	光镊研究驱动蛋白.....	11
1.4.1	CENP-E 与微管.....	12
1.4.2	驱动蛋白行走步骤.....	12
1.4.3	驱动蛋白解离力.....	13
1.4.4	GSK 对 CENP-E 的抑制机理.....	15
1.5	光镊研究蛋白结构与相互作用.....	15
1.5.1	光镊研究 SNARE 蛋白结构.....	16
1.5.2	CENP-T/W 蛋白.....	17
1.6	单像素成像技术.....	18
1.7	本文主要研究内容.....	19
第 2 章	纳米级光镊系统的稳定性研究.....	21
2.1	光镊系统设计.....	21
2.1.1	低噪声探测光路.....	24
2.1.2	原位电压系数和光阱刚度标定.....	24
2.1.3	反馈补偿系统的漂移.....	28
2.2	生物实验测试.....	33
2.2.1	DNA 拉伸相变曲线.....	33
2.2.2	溶液粘滞系数测量.....	35
2.2.3	细胞的功率谱标定.....	37
2.3	样品室底面修饰.....	37
2.4	光镊系统控制程序设计.....	39
2.5	本章小结.....	40
第 3 章	光镊研究 rpoS RNA 自抑制茎环结构.....	41
3.1	拉伸实验方案.....	41
3.2	rpoS RNA 样品制备.....	44
3.2.1	模板 DNA 制备方法与流程.....	44
3.2.2	转录 rpoS RNA 流程.....	45

3.2.3	DNA 手柄制备 .....	46
3.2.4	RNA/DNA 手柄退火 .....	46
3.2.5	样品室内样品制作 .....	47
3.3	<i>rpoS</i> RNA 的力谱特性 .....	47
3.3.1	拉伸曲线打开长度计算 .....	48
3.3.2	<i>rpoS</i> RNA 自抑制茎环的打开路径 .....	50
3.3.3	蠕虫链模型 .....	52
3.3.4	<i>rpoS</i> RNA 的蠕虫链模型拟合 .....	54
3.4	<i>rpoS</i> RNA 自抑制茎环折叠自由能 .....	56
3.4.1	MFold 预测自抑制茎环折叠自由能 .....	56
3.4.2	“力-伸展”曲线计算自抑制茎环折叠自由能 .....	57
3.4.3	自抑制茎环局部结构自由能计算 .....	59
3.5	镁离子对 <i>rpoS</i> RNA 自抑制茎环的影响 .....	59
3.5.1	小角 X 射线散射结果 (生物合作) .....	59
3.5.2	原子力显微镜结果 .....	61
3.5.3	镁离子对自抑制茎环核心部分的影响 .....	62
3.5.4	镁离子对自抑制茎环的影响 .....	63
3.6	本章小结 .....	64
第 4 章	光镊研究着丝粒相关蛋白 .....	67
4.1	CENP-E 与其小分子抑制剂研究 .....	67
4.1.1	样品制备与观察 .....	67
4.1.2	K560 与 CENP-E 动力学特性 .....	69
4.1.3	GSK 与 Syntelin 抑制机理研究 .....	74
4.1.4	CENP-E 突变体动力学特性 .....	76
4.2	CENP-T/W 间相互作用 .....	77
4.2.1	CENP-T/W 偶联方案 .....	78
4.2.2	CENP-T/W 拉伸方案 .....	78
4.2.3	力谱曲线分析 .....	79
4.3	本章小结 .....	82
第 5 章	单像素相位成像 .....	83
5.1	优化的 Lee 算法 .....	83
5.1.1	Lee 方法编码复杂光场 .....	84
5.1.2	优化的 Lee 方法 .....	86
5.1.3	仿真结果 .....	86
5.1.4	实验结果 .....	89
5.1.5	基于 OAM 模式的信息编码 .....	91
5.2	单像素相位成像 .....	92
5.2.1	单像素相位成像原理 .....	93
5.2.2	单像素相位成像实验 .....	94
5.2.3	单像素相位成像结果 .....	95
5.3	本章小结 .....	98
第 6 章	总结与展望 .....	99
6.1	论文总结 .....	99
6.2	工作展望 .....	100

## 目 录

---

参考文献.....	101
致 谢.....	110
博士期间发表的学术论文与其他研究成果.....	111

## 第1章 绪论

光镊 (optical tweezers) 是利用高度会聚激光产生的力学效应对微米、亚微米级粒子进行非接触操控的前沿技术。早在 1970 年 Ashkin 通过两束相对传播激光的散射力实现了对微米级大小物体的操控<sup>[1]</sup>。于 1986 年, Ashkin 与朱棣文等人利用激光焦点附近光场梯度力平衡光场散射力的方法, 用一束会聚的激光实现了对微米级物体的三维捕获<sup>[2]</sup>。这种“单光束梯度力光阱”具有抓住物体的作用, 所以被称为光学镊子—光镊。

光镊易于操控微米级物体的特点使它在生命科学研究中拥有独特的一面, 从而成为了生物物理交叉学科的实用工具。1987 年 Ashkin 首次用这个全新的工具实现了对细胞的操控<sup>[3]</sup>, Aist 等人进一步联合光刀技术实现了对细胞进行“手术”<sup>[4]</sup>, 这一技术路线已经用于分选单条水稻染色体<sup>[5]</sup>。2002 年 Kas 等人使用光镊引导了神经细胞的生长<sup>[6]</sup>, 2013 年光镊又被成功引入活体细胞的研究<sup>[7]</sup>。随着半导体技术的进步, 人们将 QPD (四象限光电探测器) 或 PSD (位置敏感探测器) 耦合进光镊技术中用于探测光镊捕获物体的位置变化, 这使得光镊不仅可以操控微粒, 还能对位移与外力进行测量。这使得光镊拥有了定量研究科学问题的能力, 被广泛地应用在单分子生物学的研究中。为此, 2018 年的诺贝尔物理学奖颁发给了光镊技术的发明者阿瑟·阿什金 (Arthur Ashkin), 表彰了光镊技术及其在生命科学研究中获得的突出贡献。

### 1.1 单分子光镊技术现状与进展

光镊操控对象一般为微米或亚微米大小的微粒, 因此可以直接捕获细胞和细胞器。对于难以直接操控的单个生物大分子, 光镊借助探针来实现。由于探针可以制作得非常规则, 如标准微球, 这种策略有助于实现高精度的测量。单分子实验中待研究的分子连接在探针与底面或者探针与探针之间, 形成单光镊、光镊-微针、双光镊与多光镊等实验方案<sup>[8]</sup>。随着分子生物学研究的不断深入, 人们对光镊提出的要求也越来越高, 于是产生了高精度高稳定性光镊、高通量阵列单分子光镊、荧光光镊、FRET 光镊与拉曼光镊等全新光镊设备。

## 1.1.1 单光镊法

单光镊法，顾名思义就是利用单束激光操控探针对生物大分子进行研究，这种方法中生物大分子一端连接在被光镊捕获的微球之上，另一端则连接在另一个待研究分子、样品室底面或固定在样品室底面的微管之上。光镊研究驱动蛋白行走时<sup>[9-11]</sup>，采用了如图 1-1 (a) 所示的方案。实验中悬浮在溶液中的微球上连接有驱动蛋白，使用光镊捕获微球后靠近固定在样品室底面的微管，驱动蛋白会结合在微管束上并沿着微管方向行走，光镊在提供负载力的同时测量微球的位置变化，得到驱动蛋白的行走在过程。单光镊法研究 RNA 聚合酶时<sup>[12]</sup>，采用了如图 1-1 (b) 所示的方案。RNA 聚合酶连接在被光镊捕获的微球之上，同时与待转录 DNA 模板一端相连，DNA 模板另一端则连接在样品室底面上。当 RNA 聚合酶进行转录时，微球会沿着 DNA 方向运动，通过光镊测量力的大小与微球的位移来研究 RNA 聚合酶的转录过程。这两种研究方案都是根据待研究体系而设计的，拥有自身的优点和局限性，例如用第一种方法研究蛋白弹性，会因为微球距离玻片底面太近而测力不准；第二种方法在研究短链样品（500 nm~5 μm）时，分子链与底面有较大夹角，使得微球在光阱中受力产生轴向分量，影响测量精度。

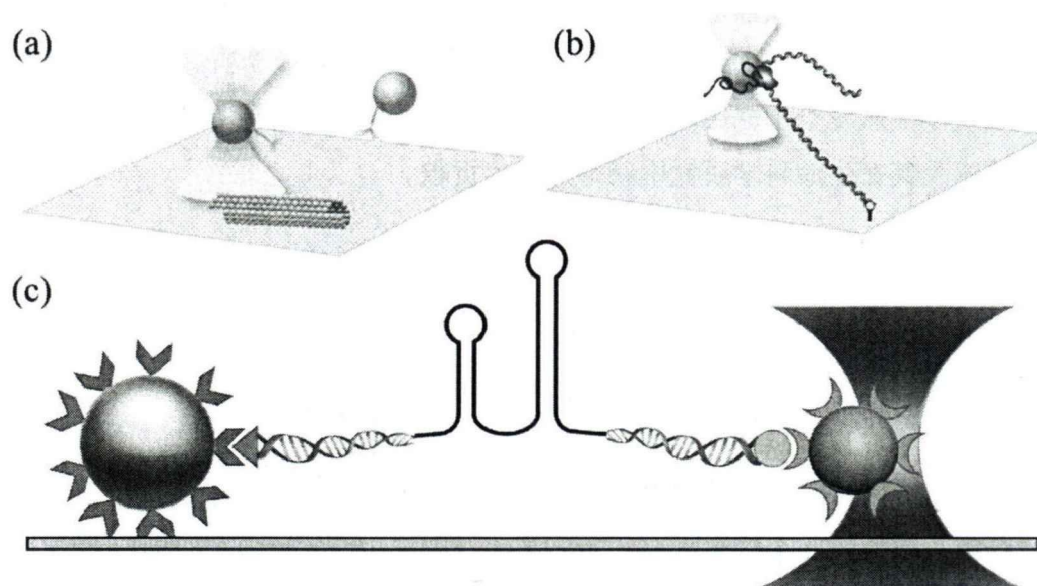


图 1-1 单光镊实验方案示意图<sup>[8]</sup>。

(a) 图为单光镊法研究驱动蛋白沿微管行走。(b) 图为单光镊法研究 RNA 聚合酶。(c) 图为单光镊法研究 RNA 折叠结构。

对于短链样品的研究，可以采取图 1-1 (c) 所示的方法。先将一个较大微

球固定在样品室底面，然后将待研究分子连接在两个微球之间，两微球中心高度对齐。用该方案研究，避免了第二种方案中分子链倾角较大的问题，本文在研究 *rpoS* RNA 自抑制茎环结构时，采取了这种方案。

### 1.1.2 微针-光镊法

2008 年 Bustamante 等人在研究核糖体时使用了微针-光镊实验方法<sup>[13]</sup>，方法如图 1-2 (a) 所示。待研究的分子处于被微针固定的微球与光镊捕获的微球之间，这种方案能在样品室较深的位置进行实验，避免了样品室底面引起的偏差。而且该方法对于微球的固定比粘连在样品室底面更加牢固，是目前单分子光镊领域中常用的做法。

### 1.1.3 双光镊与多光镊法

双光镊也是一种常用的单分子研究策略。如图 1-2 (b) 所示，待研究分子两端的微球使用两束独立的光镊进行捕获，分子上的外力通过控制其中一个光阱的位置来完成。双光镊系统中实验区域不仅距离样品室底面较远，同时样品室（或微针）机械漂移不会对实验带来影响，两个光镊的位置都只与物镜有关，因此无论是拉伸还是恒力模式<sup>[14-16]</sup>，都能很好地驾驭。

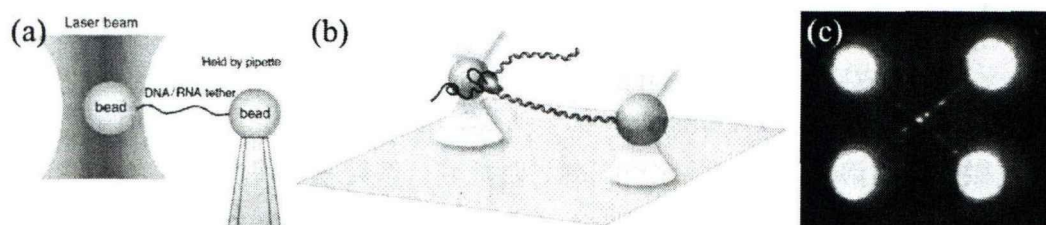


图 1-2 微针-光镊法与多光镊法示意图<sup>[8, 13]</sup>。

(a) 图为微针-光镊法。(b) 图为双光镊。(c) 图为多光镊法实验图像。

例如 Sweeney 等人利用双光镊固定了一根肌动纤维，研究了肌球蛋白 VI 沿肌动纤维的步进式行走<sup>[17]</sup>。双光镊法缺点在于两个光阱互相靠近时，两个小球会同时受到两个光镊的影响，不适合研究短链分子。在一些特殊环境中还会用到多光镊<sup>[18, 19]</sup>，例如图 1-2 (c) 中四个光镊固定了两条 DNA 分子，DNA 桥连蛋白 XLF 为图中红色荧光标记的位置，XRCC4 蛋白为图中绿色荧光标记的位置，它们都独自连接在每条 DNA 上。当两种蛋白和 DNA 结合在一起时（橙色荧光位置），能形成 DNA 之间的桥连<sup>[20]</sup>。

### 1.1.4 高通量单分子光镊

2014 年 Michelle D. Wang 等人利用微纳加工技术制作了纳米光子驻波阵列光阱 (Nanophotonic Standing-wave Array Trap, nSWAT) [21], nSWAT 结构如图 1-3 (a) 所示。nSWAT 用硅材料作为光波导, 将入射激光分成两路相对传播的光束, 在硅波导中形成驻波, 利用驻波的光场梯度实现微粒的捕获。在相对传播光束中的一束上加加载一段加热装置, 通过改变波导内的光程, 而改变两束激光光程差, 实现对光阱位置的控制。

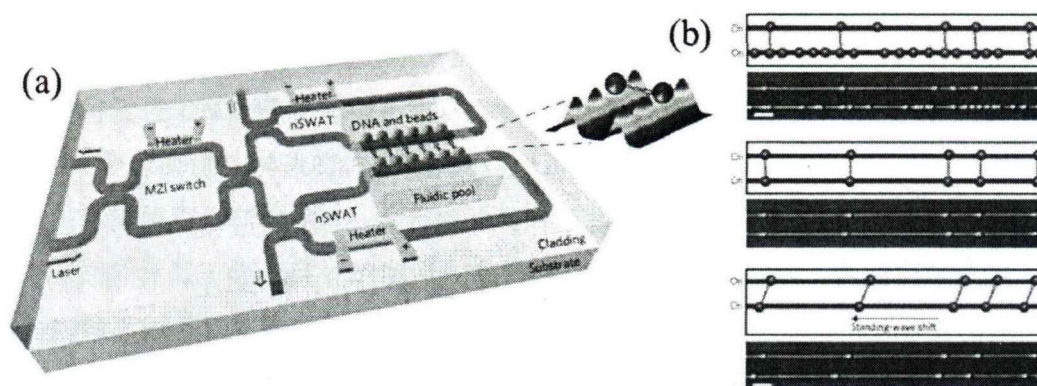


图 1-3 高通量单分子光镊示意图[21]。

(a) 图为微纳加工的单分子光镊示意图。(b) 图为高通量单分子光镊进行 DNA 拉伸的示意与实验图像。

nSWAT 进行 DNA 拉伸如图 1-3 (b) 所示, 先向样品室中输入中间偶联有 DNA 的微球样品溶液, 很多微球被阵列光阱捕获。然后通入缓冲液, 清洗掉中间没有连接 DNA 的单个微球与样品残余液体, 最后通过移动光阱阵列的位置拉伸微球间的 DNA 分子。这种光镊设备一次可以同时进行几十到上百个分子的拉伸, 补充了传统单分子光镊中一次只能对一个分子拉伸的不足; nSWAT 的功率低, 能量利用非常高效; 特别是这种芯片式的光镊不存在机械漂移, 非常稳定, 该仪器也容易和荧光显微技术等相结合。

### 1.1.5 荧光光镊

荧光成像是生命科学研究中常用的手段, 荧光与光镊的结合使得研究中, 在获得分子力谱的同时也能得到荧光标记分子的位置信息[22-24]。Ishii 等人结合光镊、全内反射荧光显微镜 (Total Internal Reflection Fluorescence Microscope, TIRF) 与荧光显微镜研究了肌球蛋白沿肌动蛋白运动的精细过程[25]。光镊与

TIRF 的结合还可以分辨平行微管束与反平行微管束<sup>[26]</sup>, 演示解旋酶在单链 DNA 上的移动<sup>[27]</sup>, 发现中心着丝粒组件 Mis12/MIND 增强微管 (microtubule) 与外部 Ndc80 复合体之间的亲和力<sup>[28]</sup>等。Ganim 和 Rief 等人则直接研究了绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP) 在光镊拉伸过程中的荧光变化<sup>[29]</sup>。实验发现光镊产生的张力会破坏 GFP 的空间结构并导致荧光消失, 直到张力解除, 蛋白重新折叠后荧光才得到恢复。

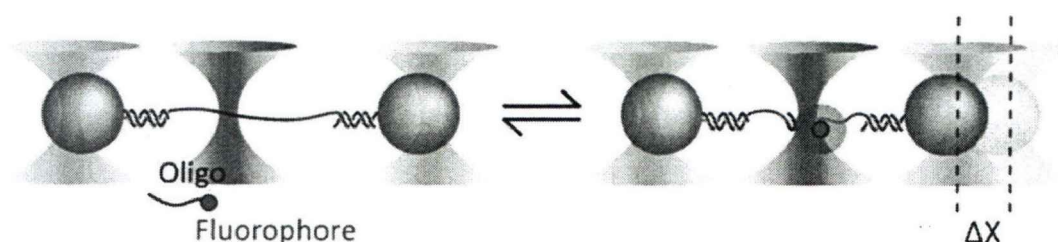


图 1-4 光镊结合共聚焦荧光研究超短核苷酸链弹性行为示意图<sup>[30]</sup>。

2018 年 Chemla 等人研究了超短核苷酸链 (<15 nucleotides, nt) 的弹性行为<sup>[30]</sup>, 实验方案如图 1-4 所示。图中黑线代表含有结合位点的中心单链 DNA 区域, 它与长度为 7-12 nt 的寡核苷酸链 (oligonucleotides, Oligo) 互补配对结合。中心区域通过多聚胸腺嘧啶 (poly-dT, 红色) 与双链 DNA 手柄 (蓝色) 隔开, 后连接在两个微球之间, 微球用双光镊系统进行操控, 通过 Oligo 上带的荧光分子区分中心区域是单链 DNA 还是互补配对后的双链 DNA。实验研究了超短核苷酸链在单链与双链情况下, 端到端伸长距离的差。结果发现在较低外力 (< 8 pN) 条件下与长聚合物模型基本一致, 但在较高外力 (> 8 pN) 时比模型预测的要小, 显示出序列决定的双边缘效应。

### 1.1.6 FRET 光镊

荧光能量共振转移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 技术是检测生物大分子中纳米级距离及其变化的重要工具<sup>[31-33]</sup>, 将这项技术引入光镊之中可以帮助研究者揭示生物大分子三级结构的变化。例如, Block 等人在研究硫胺焦磷酸核糖开关 (thiamine pyrophosphate riboswitch)<sup>[34]</sup>时, 成功发现了在两种预先识别出的配体结合状态中, 螺旋臂 (helix-arm) 的方向有所不同。2016 年 Ha 等人研究了蜘蛛丝的弹性与长度变化, 发现蜘蛛丝的弹性是线性行为, 而不是无序聚合物的非线性行为<sup>[35]</sup>。当蜘蛛丝被拉长时, FRET 变弱, 蜘蛛丝松弛时, FRET 变强。进一步, Hohng 与 Lee 将光镊与三种颜色 FRET 相结合, 成功观察到了 Holliday-junction 结构中三个螺旋臂在外力下的相对运动



[36], 还对 RNA 中两个长度相同发卡结构的打开顺序进行区分。

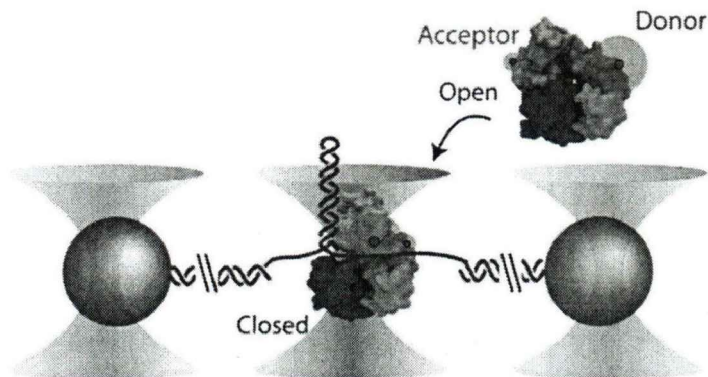


图 1-5 双光镊与 FRET 技术结合示意图<sup>[37]</sup>。

研究大肠杆菌 UvrD 解旋酶构象及解旋动力学过程设备如图 1-5 所示<sup>[37]</sup>, UvrD 解旋酶拥有两种构象:开放构象(自由的蛋白)和封闭构象(结合的蛋白), 在解旋酶上标记受体 (Acceptor) 与供体 (Donor) 后, 通过 FRET 区分两种蛋白构象, 从而直观地看到 UvrD 解旋酶结构与功能之间的关系<sup>[38]</sup>。

## 1.2 光镊研究 DNA

DNA 是一种重要的长链生物大分子。每一个 DNA 聚合单元包括一个脱氧五碳糖分子、一个碱基、以及一个磷酸基团。碱基沿着 DNA 长链排列成的序列组成遗传密码, 是指导氨基酸合成蛋白质序列的依据。DNA 分子的物理性质和 DNA 分子与其他生物分子间的相互作用, 例如: 折叠, 包装, 复制, 转录等, 与其生物学功能密切相关。因此 DNA 分子的物理性质及它与蛋白间的相互作用是生命科学领域的核心问题。DNA 在生物体内一般以双链形式存在, 结构比较稳定, 使用光镊对它的研究主要集中于 DNA 的相变<sup>[39,40]</sup>、DNA 的力学性质<sup>[41,42]</sup>、DNA 与蛋白相互作用<sup>[43,44]</sup>和 DNA 与核小体相互作用<sup>[45]</sup>等。

### 1.2.1 DNA 过拉伸

1996 年 Carlos Bustamant 与 Steven B. Smith 等做了一项非常有先驱性的工作, 他们通过光镊对双链 DNA 进行了过拉伸, 研究了双链 DNA 在较大外力下的相变过程<sup>43</sup>, 这项工作将光镊引入了单分子力谱领域。

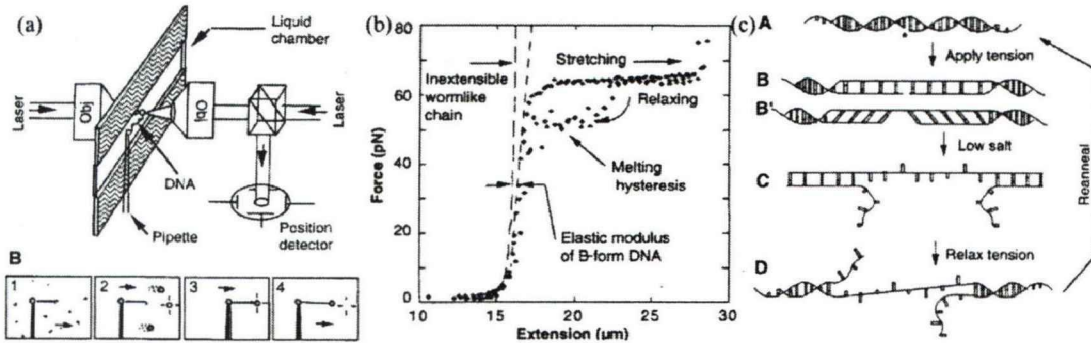


图 1-6 光镊过拉伸 DNA 实验<sup>[43]</sup>。

(a) 图为实验装置。(b) 图为“力-伸展”曲线。(c) 图为 DNA 的相变示意图。

实验使用“光镊-微针”方案，双链 DNA 连接在微球之间，通过光镊操控微球进行拉伸，如图 1-6 (a) 所示。实验得到的双链 DNA “力-伸展”曲线如图 1-6 (b) 所示，拉伸曲线在较低外力情况下与蠕虫链模型吻合良好，随着外力的增大，在 65 pN 外力的位置处出现了一个“平台”，DNA 分子的距离在伸长但外力基本不变。在之后的回复过程中，回复曲线在相变平台附近与拉伸曲线并不重合，而是在分子长度减小的同时外力也有所下降，最终在回复到低力区后与拉伸曲线重合。

DNA 的过拉伸曲线对应图 1-6 (c) 所示的过程。在没有外力的情况下形成双螺旋结构，在外力拉伸过程中，DNA 的双螺旋会渐渐展开，可能形成“平行梯子 (parallel ladder)”结构 (B)，也可能因为带切口而形成“倾斜梯子 (skewed ladder)”结构 (B')<sup>[46]</sup>。如果拉伸外力继续保持几秒钟时间，DNA 的切口部分开始融化，并向缺口两侧扩展。当外力被释放时，DNA 中保持碱基配对的部分会迅速恢复到 B-DNA 状态，但已经融化的部分需要时间重新进行退火 (reanneal)，这就是拉伸与回复曲线不重合的原因。在之后的单分子光镊研究中，DNA 过拉伸实验曲线成为光镊系统测试与校准的重要方法。

### 1.2.2 核小体

核小体是染色体的基本结构单位，由 DNA 和组蛋白 (histone) 构成。4 种组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 每种各两个形成一个八聚体，作为核小体的核心颗粒 (core particle)，146 bp (base pair, 碱基对) 的 DNA 分子在组蛋白八聚体核心颗粒的外表面上盘绕 1.67 圈，再由约 60 bp 的 DNA 与组蛋白 H1 共同构成连接区，将多个核心颗粒连接起来形成串珠状的染色质细丝。

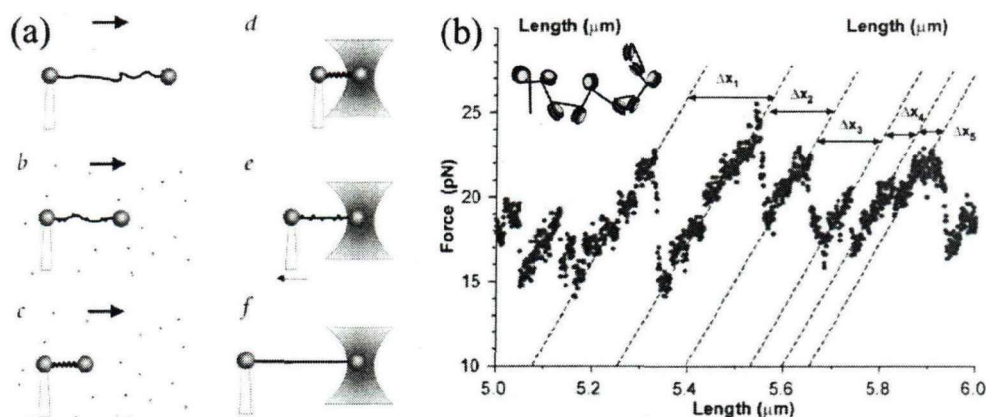


图 1-7 光镊拉伸核小体示意图与拉伸曲线<sup>[45]</sup>。

(a) 图为实验示意图，(b) 图为“力-伸长”曲线，其中横坐标为分子长度，单位微米，纵坐标为外力，单位 pN，插图为核小体结构示意图。

2001 年 Martin 等人用光镊研究了 DNA 与核小体核心颗粒间的相互作用<sup>[45]</sup>，实验发现核小体的装配受到力的调控，并且在外力超过 10 pN 情况下不会进行组装。实验采用“光镊-微针”系统，将一个聚苯乙烯 (Polystyrene, PS) 微球固定在微针尖端，并通过一条  $\lambda$ -DNA 分子与被光镊捕获的另一个微球连接，如图 1-7 (a) 所示。在样品室中通入含有核心组蛋白的溶液，发现 DNA 会渐渐缩短并最终停下来。用光镊对核小体组装的 DNA 进行拉伸，拉伸的“力-伸展”曲线如图 1-7 (b) 所示，曲线中出现了离散的、锯齿形的下降，这对应于核小体核心颗粒打开事件。核小体打开后，染色质丝长度增加了 65 nm，与缠绕在八聚体上的 DNA 长度相同。打开单个核小体所需外力在 20~40 pN 的范围内，与已经报道的 RNA 聚合酶/DNA 聚合酶所能提供的力为同一个数量级。

### 1.3 光镊研究 RNA 结构

RNA 是一种由核糖核酸构成的长链大分子，在基因的编码、解码、调控和表达中起着重要的生物学作用。与 DNA 不同，RNA 常以单链自折叠的形式存在，而不是成对的双链。这种特性使其拥有非常复杂的二级与三级结构，所以研究 RNA 的二、三级结构变化与它如何行使生物学功能成为目前生物研究中非常重要的课题。学术界自 2001 年开始关注 RNA 结构在拉伸下的表现，光镊拉伸 RNA 的实验方法趋于成熟<sup>[47, 48]</sup>，为研究 RNA 分子结构和机械性质奠定了基础<sup>[49, 50]</sup>。2011 年光镊开始用于研究 RNA 分子结构变化的动态机制和与 RNA 相关的基因调控过程<sup>[51, 52]</sup>，这些研究成果加深了人们对 RNA 结构和基因调控的

理解<sup>[51, 53]</sup>。用光镊技术研究 RNA-蛋白复合体可以揭示复合体结构与功能之间的关系, 测量结构改变所导致的自由能变化<sup>[48, 52]</sup>, 帮助人们了解包括基因调控在内的生物现象。包括基因组计划在内的研究表明生物体内大部分基因并不编码蛋白, 而是以 RNA 形式行使其功能。因此利用光镊研究 RNA 的空间结构和动态变化是生物物理学的前沿方向。

### 1.3.1 光镊研究 RNA 方法

2001 年 Bustamante 等人用光镊研究了 RNA 的发卡结构, 打开了光镊研究 RNA 结构的大门, 也为后人使用光镊研究 RNA 结构建立了基础技术方案与研究方法框架<sup>52</sup>。他们实验观察到了 RNA 发卡结构在外力作用下的打开与关闭过程, 并且在恒定外力情况下观察到了 RNA 发卡结构在二态之间的跃变。实验测定了折叠/展开这些单链 RNA 分子的平衡常数和反应坐标中的过渡态位置。

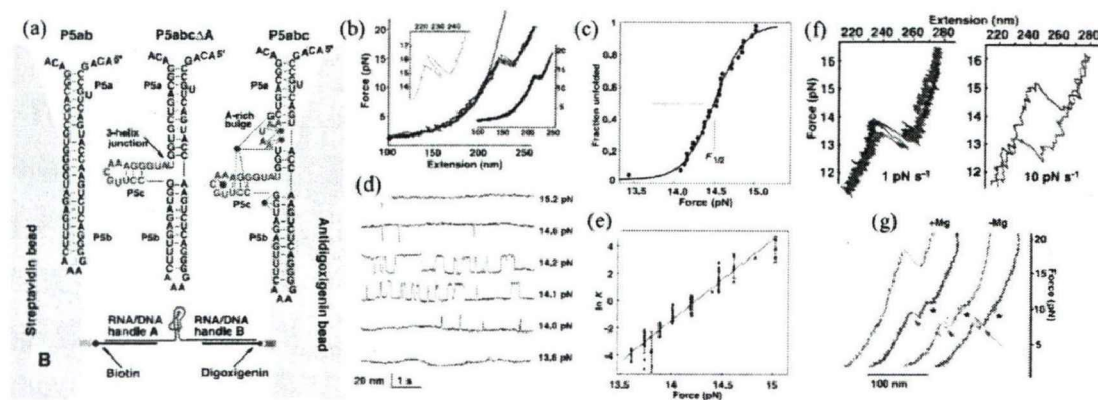


图 1-8 光镊研究 RNA 分子结构<sup>52</sup>。

(a) 图为 RNA 分子序列与偶联方式示意图。(b) 图为“力-伸展”曲线, 横坐标为伸长, 单位纳米, 纵坐标为外力, 单位 pN。(c) 图为结构打开概率-外力曲线, 横坐标为外力大小, 单位 pN, 纵坐标为 RNA 发卡结构打开概率。(d) 图为不同的恒定外力下, RNA 发卡长度随时间的变化。(e) 图为热力学平衡常数  $K$  的对数随外力的变化。(f) 图为“力-伸展”曲线中的精细结构, 蓝线与绿线分别对应于拉伸过程与回复过程。(g) 在溶液环境中含/不含有镁离子条件下, RNA “力-伸展”曲线的对比图。

实验研究的 RNA 结构如图 1-8 (a) 所示, 待研究 RNA 两侧各有一段 DNA-RNA 杂交手柄, 分别通过链霉亲和素-生物素与地高辛抗体-地高辛的特异性偶联连接在两个微球之上。用光镊对分子进行拉伸得到的“力-伸展”曲线, 如图 1-8 (b) 所示, 曲线中的“跳跃”结构对应于 RNA 中发卡结构被打开的过程。统计分析表明, 发卡打开概率与外力大小的关系满足二态模型分布  $p(E) = 1 / (1 + e^{E/k_B T})$ 。利用拟合求解出打开概率为 0.5 时对应的外力, 并通过曲

线测量出发卡的长度，从而得到打开发卡结构所需自由能。实验在光镊施加不同恒定外力下，记录了 RNA 发卡长度随时间的变化，如图 1-8 (d) 所示。观察到发卡结构在折叠/展开二态间反复跳变的过程。对图 1-8 (d) 中曲线进行分析得到不同外力下二态的平均寿命 (lifetimes)，进一步求解出二态系统的平衡常数  $K$ ，如图 1-8 (e) 所示，满足  $\frac{d \ln K(F)}{dF} = \frac{\Delta x(F)}{k_B T}$  关系式。图 1-8 (f) 展示了在不同加载力速度下，发卡结构在打开/回复中的精细过程。在加载力速度较小时，发夹结构会出现快速地反复跳跃；同时发卡结构打开与关闭对应力的差值比高加载力速度时要小。实验还研究了镁离子对 RNA 拉伸曲线的影响，结果如图 1-8 (g) 所示。

了在不同加载力速度下，发卡结构在打开/回复中的精细过程。在加载力速度较小时，发夹结构会出现快速地反复跳跃；同时发卡结构打开与关闭对应力的差值比高加载力速度时要小。实验还研究了镁离子对 RNA 拉伸曲线的影响，结果如图 1-8 (g) 所示。

了在不同加载力速度下，发卡结构在打开/回复中的精细过程。在加载力速度较小时，发夹结构会出现快速地反复跳跃；同时发卡结构打开与关闭对应力的差值比高加载力速度时要小。实验还研究了镁离子对 RNA 拉伸曲线的影响，结果如图 1-8 (g) 所示。

### 1.3.2 rpoS RNA

细菌在生命周期中必须应对高温、饥饿、渗透压、pH 值变化等环境压力，为此细菌采取一种全局应激反应来应对恶劣的环境变化<sup>[54]</sup>。对大肠杆菌来说，这种反应通过 *rpoS* 基因的表达来实现。*RpoS* 基因的表达可直接或间接调控约 500 个下游基因，约占大肠杆菌基因组的 10%，是细菌适应环境并生存繁衍的重要基因<sup>[55, 56]</sup>。所以研究 *rpoS* mRNA 非编码区结构以及如何对基因进行转录后调控，对细菌抗药性和医学临床研究具有重要意义。

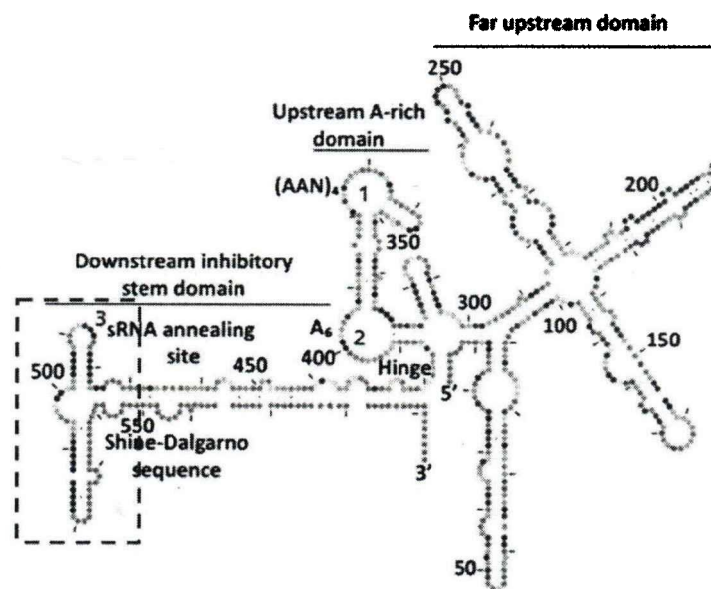


图 1-9 *RpoS* RNA 5' UTR 区域二级结构示意图

*RpoS* mRNA 通常处于抑制状态，其 5' UTR (5' Untranslation Region) 的 SD (Shine-Dalgarno) 序列被折叠在自抑制茎环内无法与核糖体结合，从而处

于关闭状态<sup>[54, 57]</sup>, 如图 1-9 所示。在应激条件下, 细菌会表达不同的 sRNA。这些 sRNA 在 Hfq 蛋白的帮助下, 能够与 *rpoS* RNA 5' UTR 上特定区域互补配对, 通过竞争的方式使 SD 区域暴露出来, 从而解除自抑制机制<sup>[58, 59]</sup>。Peng 等人研究表明, Hfq 通过 *rpoS* 上的多个相互作用位点将 *rpoS* mRNA 引导区折叠成特定的三级结构, 包括经典(AAN)<sub>4</sub> 结构和“U<sub>5</sub>”环状结构。其中“U<sub>5</sub>”环状结构位于 *rpoS* mRNA 引导区, 和下游的三个茎环组成了一个“three-way junction”的结构。Hfq 蛋白会与该段序列产生相互作用, 促进 sRNA 的退火与核糖体的进一步结合<sup>[57]</sup>。因此, 研究自抑制茎环的空间结构和折叠动力学具有重要的生物学意义, 这将有助于进一步理解 Hfq 蛋白介导的 sRNA-mRNA 退火过程。本文的工作之一便是使用光镊研究 *rpoS* RNA 自抑制茎环结构。

#### 1.4 光镊研究驱动蛋白

驱动蛋白(kinesin)是生物体内一类可以产生机械力的蛋白, 它通过水解 ATP 将化学能转化为机械能, 从而实现沿着微管运动的功能。Vale 等人于 1985 年在神经细胞内发现了第一种驱动蛋白——驱动蛋白-1(kinesin-1)<sup>[60]</sup>。Kinesin-1 会向着微管的正向进行运动, 具有长时间的持续行走能力, 它在细胞内主要参与膜类细胞器的运输, 同时也参与内质网、高尔基体、线粒体内体相关蛋白的运输。1990 年 Block 等人第一次用光镊观察到了单个 kinesin-1 沿微管的行走<sup>[10]</sup>, 1993 年观测到驱动蛋白以 8.3 nm 为步长的阶跃式行走<sup>[11]</sup>, 步长恰好与构成微管重复单元 $\alpha$ - $\beta$ 二聚体的长度相等, 这与人们对于微管(microtubule)结构的认知相吻合。1994 年 Block 等人又测量了单个马达蛋白运动速度与外部负载力及 ATP 浓度的关系<sup>[61, 62]</sup>, 实验发现 kinesin-1 的运动速度随负载力的增大而呈线性关系减小, 最大行走速度约为 800 nm/s, 最大负载力约为 5~6 pN, 单个驱动蛋白行走一步所做的功约为 48 pN·nm。kinesin-1 每行走一步需要消耗一个 ATP 水解所产生的化学能<sup>[63]</sup>, 由此推算 kinesin-1 分子的能量利用效率约为 60%。随着研究的深入, 研究者还发现驱动蛋白的运动方式为非对称“移交手”模型(asymmetric hand-over-hand model)<sup>[64-66]</sup>。两个马达头在微管上行走时前后位置彼此交换, 但 kinesin 分子的始末状态并不是对称的, 即交替的两步行走之间存在不同。同时研究者们还提出了 kinesin 的后脚协调机制<sup>[67]</sup>与前脚协调机制<sup>[68]</sup>, 发现 ATP 偏好于结合到 kinesin 的前脚上<sup>[69, 70]</sup>。

### 1.4.1 CENP-E 与微管

CENP-E (Centromere-associated Protein E, 着丝粒相关蛋白 E) 是一种类似于 kinesin-1 的蛋白, 它出现在细胞分裂过程的前中期并聚集在染色体的着丝粒区域<sup>[71-73]</sup>。CENP-E 被认为是哺乳动物染色体运动和纺锤体伸长的发动机之一, 帮助细胞在有丝分裂过程中将染色体平均分配成两部分, 是维持动点-微管稳定的重要大分子驱动蛋白。

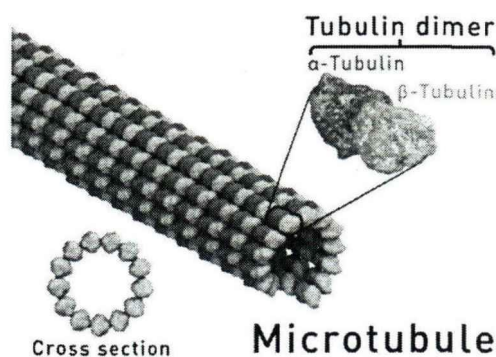


图 1-10 微管结构示意图

类似于其它驱动蛋白, CENP-E 也会沿着微管行走, 从而实现在细胞内进行物质运输或信号传导。微管是真核细胞中普遍存在的一种纤维结构, 横截面为一个圆环, 直径约 22~25 nm, 整体形貌如同一根笔直中空的管子。微管一般作为细胞骨架而存在, 用于维持细胞形态, 帮助细胞分裂。微管是由 $\alpha$ -微管蛋白 ( $\alpha$ -Tubulin) 与 $\beta$ -微管蛋白 ( $\beta$ -Tubulin) 相间聚合而成, 结构如图 1-10 所示<sup>[74, 75]</sup>。微管具有独特的极性, 对它的生物学功能至关重要。 $\alpha$ -微管蛋白与 $\beta$ -微管蛋白会形成一个二聚体,  $\alpha$ -微管蛋白暴露一端为负端,  $\beta$ -微管蛋白暴露一端为正端, 正端与负端相连。微管可以朝两个方向生长, 但正端伸长的更快, 绝大部分的驱动蛋白是按照正端到负端的方向行走。

### 1.4.2 驱动蛋白行走步骤

光镊研究驱动蛋白行走的方法如图 1-11 (a) 所示, 将微管固定在样品室底面, 用偶联有驱动蛋白的微球靠近微管。当驱动蛋白与微管接触后, 驱动蛋白会有一定概率结合并沿着微管行走。一旦驱动蛋白开始行走, 就会拖动光镊中的微球, 微球偏离光阱中心的运动被探测器记录, 从而得到驱动蛋白的运动曲线。微球远离光阱中心会受到光阱的线性回复力, 为驱动蛋白运动加上了负载力, 以这种方式人们可以研究驱动蛋白在负载力下的运动行为。如果需要研究

恒定负载力下驱动蛋白的运动特性，则需要加入反馈系统，在驱动蛋白带着微球向前运动的同时，光镊位置也随之改变，以保证微球偏离光阱中心距离恒定。借助于光镊、电子顺磁共振、冷冻电镜和荧光标记等多种手段，得到的驱动蛋白行走过程一般形态如图 1-11 (c) 所示。

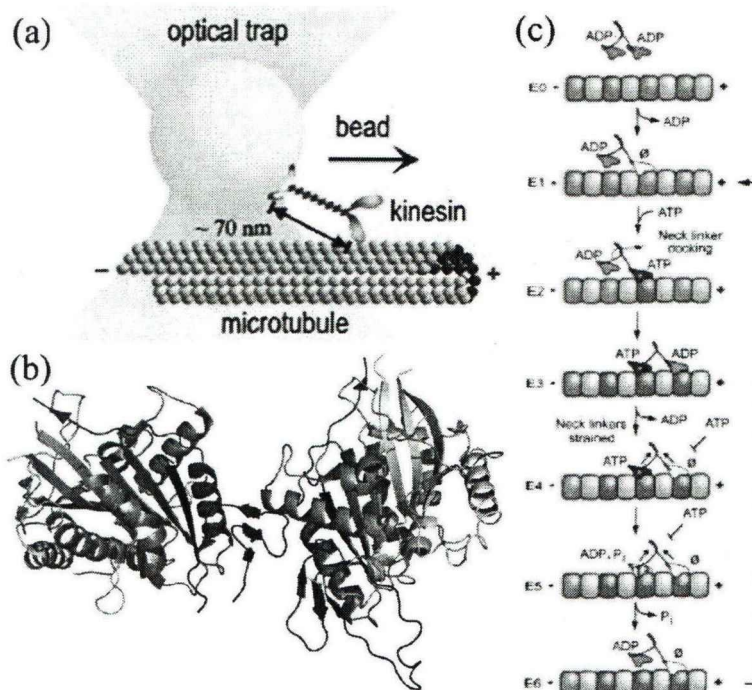


图 1-11 光镊研究驱动蛋白方法与 CENP-E 行走示意图。

(a) 图为实验方法，(b) 图为 CENP-E 分子的空间结构，(c) 图为 CENP-E 行走过程。

以 CENP-E 为例，CENP-E 由两个蛋白单体聚合成为一个二聚体，结构如图 1-11 (b) 所示。两个蛋白单体像双腿一样沿着微管迈步行走，如图 1-11 (c) 所示，CENP-E 中的一只脚会先结合到微管上并释放原本结合的 ADP，之后 ATP 过来与空脚结合，使 CENP-E、ATP 与微管三者形成一个稳定的复合体。然后 CENP-E 改变其构型，后脚向前结合在微管上并释放 ADP；后脚释放一个磷酸根，ATP 水解为 ADP，后脚便脱离微管，以此循环往复。这种形式被认为是 CENP-E 的主要行走方式。此外还存在一种先结合 ATP 再迈步的过程，即交换图中的 E2 与 E3。这两种过程可以并存，然而 ATP 的水解一定处于迈步之前<sup>[76]</sup>。

### 1.4.3 驱动蛋白解离力

2002 年 Toyoshima 等人研究了马达蛋白在不同溶液环境中解离力的区别，



如图 1-12 所示<sup>[77]</sup>。实验用的三种核酸状态分别是 1 mM ADP、1 mM AMP-PNP 与不存在核酸三种溶液环境，两种蛋白是只有单只脚的 kinesin-1 与聚合为二聚体的 kinesin-1，实验测试了这六种条件下蛋白与微管结合后的解离力大小，并统计了解离力大小分布。

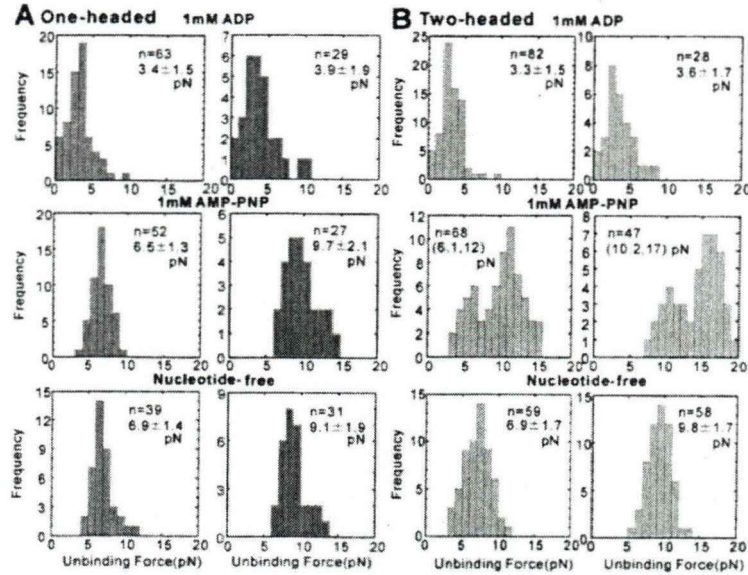


图 1-12 驱动蛋白与微管间解离力的统计分布。

(A) 图为单只脚驱动蛋白与微管间解离力的统计分布，红色与绿色分别对应于沿微管正向与负向进行拉伸时断裂力测量值的统计分布，上中下三行分别对应于 1 mM ADP、1 mM AMP-PNP 与不存在核酸三种溶液环境。(B) 图为两只脚驱动蛋白与微管间解离力的统计分布。

在实验过程中，光镊分别沿微管正向与负向进行拉伸，发现沿微管负向拉伸的解离力大于正向拉伸的解离力。在溶液存在 ADP 时，测出马达蛋白一只脚结合 ADP 后连接在微管上正向解离力为 3.3pN 左右，与驱动蛋白在微管上行走的解离力相近。实验表明驱动蛋白沿微管行走发生错误后，驱动蛋白一只脚结合 ADP 后连接在微管上，此时的结合非常脆弱，容易从微管上脱离。测量了用 ATP 代替物 AMP-PNP 情况下的解离力。不能水解的 AMP-PNP 可以代替 ATP 与马达蛋白结合，所以马达蛋白结合 AMP-PNP 后连接在微管上的解离力与马达蛋白结合 ATP 后连接在微管上的解离力相近，测量正向解离力为 6.1 pN 或 12 pN，双峰值对应的是一只脚连接在微管上还是两只脚都连接在微管上的区别，解离力表明这是一种较为牢固的连接。实验还测试了在不加入 ATP 与 ADP 的情况下，空脚与微管之间的解离力，正向解离力在 6.9 pN 左右，也是一种较强的连接。而且只有图 1-12 B 图中 AMP-PNP 实验条件下具有双峰结构，这说明 kinesin-1 在行走时，不会出现两只空脚或两只结合有 ADP 的脚同时连接在

微管上,这与人们对驱动蛋白行走过程的研究结果吻合(图 1-11 (c))。对于解离力测量的结果对我们研究 GSK 与 Syntelin 抑制 CENP-E 的机理很有帮助。

#### 1.4.4 GSK 对 CENP-E 的抑制机理

CENP-E 对于细胞的有丝分裂具有重要作用,它在有丝分裂的前中期才开始出现,主要负责哺乳动物染色体的运输与纺锤体的伸长,所以抑制 CENP-E 的运动就抑制了细胞有丝分裂。CENP-E 在乳腺癌细胞中表达尤为丰富,抑制 CENP-E 可以间接地抑制乳腺癌的扩散。小分子抑制剂 Ispinesib 已经在乳腺癌患者的治疗中得到令人满意的效果<sup>[78]</sup>,另一种小分子抑制剂 GSK-923295(GSK)能抑制多种人类肿瘤的生长<sup>[79, 80]</sup>,分子结构如图 1-13 (a) 所示。

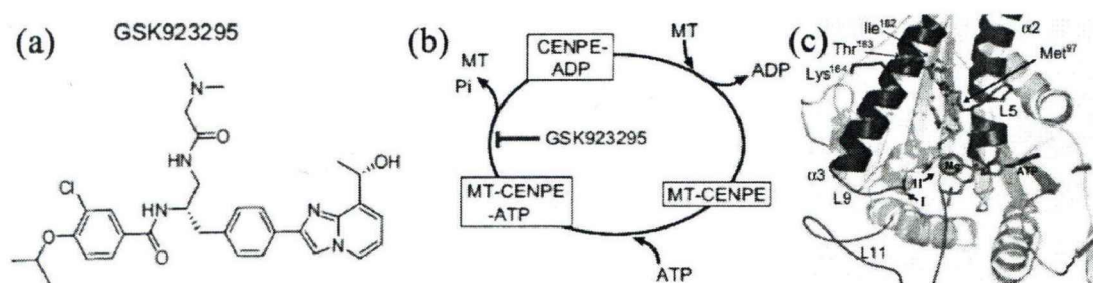


图 1-13 GSK 抑制机理图。

(a) 图为 GSK 的分子结构图。(b) 图为机制模型图。(c) 图为 GSK 固定结合有 ATP 的 CENP-E 分子空间构型图。

图 1-11 (c) 中任何一步中断都会导致 CENP-E 运动的抑制。2010 年 Jackson 等人通过生化手段与分子动力学模拟,研究发现 GSK 是通过阻断与 CENP-E 结合的 ATP 水解为 ADP 过程来抑制 CENP-E 行走的<sup>[79]</sup>,如图 1-13 (b) 所示。图 1-13 (c) 中红色分子为 ATP,中间的蓝绿色分子为 GSK,可以看出 GSK 结合位点位于 $\alpha 2$ 螺旋与 $\alpha 3$ 螺旋之间,紧挨着 CENP-E 的 L5 区域。这使得 GSK 刚好卡入到 CENP-E 的 ATP 结合区域中,从而阻止 ATP 的水解。我们通过光镊研究了 GSK 的抑制机理,得到了与该文献一致的结论。

### 1.5 光镊研究蛋白结构与相互作用

蛋白质的结构决定其功能,因此研究蛋白质结构是生命科学中非常重要也非常困难的课题。常见的研究手段有 X 射线晶体衍射、核磁共振和冷冻电镜等,每种手段都有其自身的局限性。光镊可以获得单分子力谱的信息,帮助人们了解蛋白质结构。蛋白之间经常会形成复合体,例如 1.2 节中的核小体,细胞通

过激酶对蛋白进行磷酸化等修饰对复合体的稳定性加以调控，从而对蛋白功能进行动态调控。通过光镊能在单分子水平上测量蛋白间的结合强度，直接研究分子修饰对蛋白的影响。

### 1.5.1 光镊研究 SNARE 蛋白结构

SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor) 蛋白的主要功能是介导细胞内的膜融合，特别是储存在神经末梢的囊泡融合，释放神经递质进行突触传递<sup>[81-83]</sup>。SNARE 蛋白会在膜的表面产生“融合孔 (fusion pore)”，从而允许化合物穿过分隔细胞或细胞内亚组分的膜。2018 年 Chapman 等人发现，这些融合孔是高度复杂、极度灵敏的快速触发阀门，可以在每秒内打开和关闭数千次。SNARE 蛋白通过快速地拉上拉链和解开拉链促使融合孔进行动态的切换<sup>[84]</sup>。2012 年，Yongli Zhang 等人用光镊研究 SNARE 蛋白的拉链结构<sup>[85-88]</sup>，证明了拉链结构存在的同时观察到了拉链结构快速打开/关闭的过程。

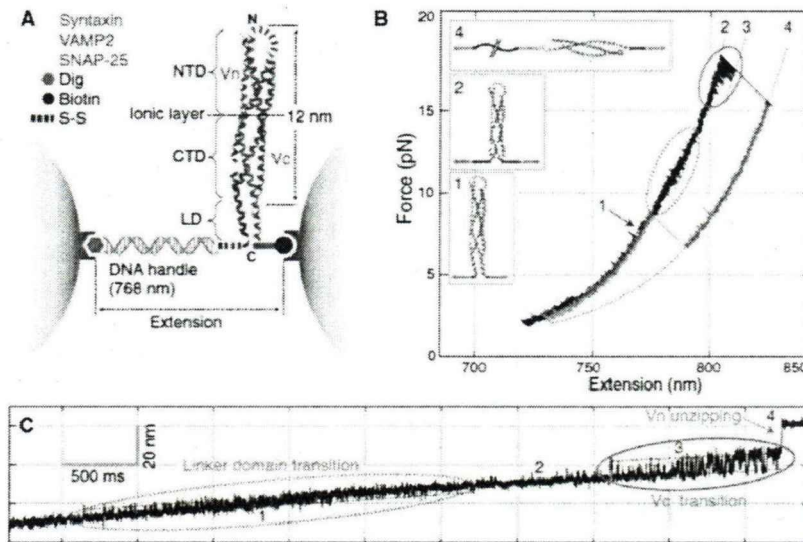


图 1-14 光镊研究 SNARE 蛋白。

(a) 图为实验方案。(b) 图为“力-伸展”曲线。(c) 图为拉伸过程中精细结构。

光镊研究 SNARE 蛋白方案如图 1-14 A 所示，由于蛋白长度较短，所以在蛋白的一端连接了一段长度约为 768 nm 的双链 DNA 手柄。DNA 手柄一端通过地高辛特异性偶联在微球上，另一端通过二硫键与 VAMP2 相连，VAMP2 的另一端与 syntaxin 的 N 端也通过二硫键进行连接，同时 syntaxin 的 C 端利用生物素特异性偶联在另一个微球上。待研究的 SNARE 复合体由 Syntaxin、SNAP-25

和 VAMP2 三部分组成, 其中 VAMP2 又分为 Vc 区与 Vn 区。图 1-14 B 为该蛋白复合体的“力-伸展”曲线, 其中有两段可快速跳变的过程, 一段发生在 8~13 pN 范围内, 平均伸展变化量约 3 nm; 另一段发生在 14~19 pN 范围内, 平均伸展变化量约 7 nm, 细节如图 1-14 C 中所示。其中第一段对应于 SNARE 复合体中的连接区域 (linker domain, LD), 第二段对应于 VAMP2 中 Vc 区域的快速跃变。第二段中的快速跃变对应于 SNARE 蛋白中的拉链结构, 不同于 Vn 段稳定结构的一次性打开, 这种拉链结构有益于蛋白实现快速切换功能, 而 Vn 段则对蛋白结构的稳定性至关重要。这项工作中建立了蛋白通过 DNA 手柄连接在微球上的方案, 对于研究蛋白间相互作用非常有借鉴意义; 研究本身也加深了对于蛋白结构与功能之间关系的理解。

### 1.5.2 CENP-T/W 蛋白

CENP-T (Centromere-associated Protein T, 着丝粒相关蛋白 T) 是一根细长形状的蛋白, 它的 C 端是组蛋白折叠区域 (Histone-fold Domain, HFD), N 端是一个长尾巴<sup>[89]</sup>。Hori 等人发现 CENP-T 因为 HFD 的存在而具有 DNA 结合的活性<sup>[90]</sup>, 同时 CENP-T 的 HFD 对着丝粒的定位也起到了重要作用。CENP-W (Centromere-associated Protein W, 着丝粒相关蛋白 W) 则是一个较小的蛋白 (<100 aa (amino acid, 氨基酸)), 它可以和 CENP-T C 端的 HFD 产生紧密结合, 从而形成 CENP-T/W 复合体<sup>[91]</sup>。CENP-T/W 形成复合体后连接动点的内层与外层, 如图 1-15 (a) 所示, CENP-T 的 N 端区域直接与 Ndc80 复合物结合<sup>[92]</sup>, 可见 CENP-T/W 是构成动点的重要元件, 而动点则是细胞有丝分裂过程的关键组成部分。进一步研究发现, CENP-T 的 N 端可以被 CDK 磷酸化, 而磷酸化位点对有丝分裂进程至关重要<sup>[93]</sup>。最新研究发现, 如果 CENP-W 不能被 Aurora B 激酶磷酸化, 那么有丝分裂会被阻断在中前期, 染色体就会破碎, 导致有丝分裂出现问题。所以我们猜想: Aurora B 激酶磷酸化会使得 CENP-T/W 结合加强, 从而稳定动点的结构。

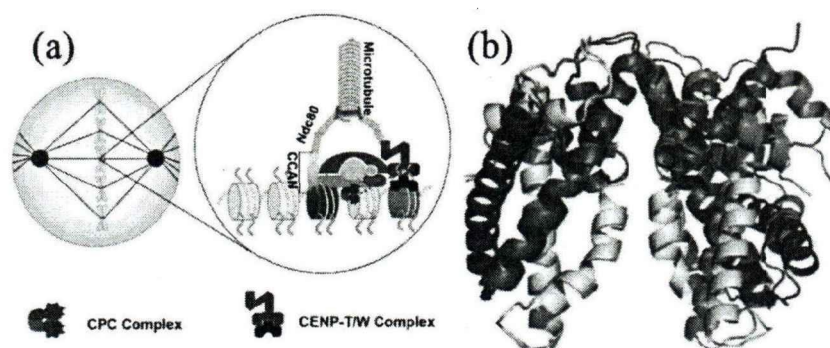


图 1-15 CENP-T/W 生物学功能示意图与 CENP-T-W-S-X 复合体结构图

进一步研究发现 CENP-T/W 与 CENP-S/X 复合体可以协同组装成稳定的 CENP-T-W-S-X 四聚体,四聚体的结构图如图 1-12(b)所示<sup>[94,95]</sup>。CENP-T-W-S-X 结构与包括核小体在内的很多组蛋白折叠复合物相似,也可以将 DNA 缠绕其上形成一种新型的核小体。随后的研究发现, CENP-T-W-S-X 复合物诱导阳性超螺旋进入 DNA,而典型组蛋白诱导阴性超螺旋<sup>[96]</sup>。同时对酵母的微染色体分析表明,着丝粒染色质中确实存在有阳性超螺旋<sup>[97]</sup>。

## 1.6 单像素成像技术

单像素成像 (Single-pixel imaging, SPI) 是一种新兴的计算成像技术。区别于传统的面阵探测 (例如 CCD 或者 CMOS 相机) 成像方法,单像素成像采用编码的结构光照明目标场景并利用单像素探测器采集关联总光强,通过计算可以准确恢复出二维场景的图像。单像素成像技术具有高信噪比、宽谱响应、无机械扫描、成像装置简易和低成本等特性。尤其是在某些特殊的电磁波段,如红外、紫外或者 X 射线等,甚至是物质波,单像素成像技术可以实现用普通相机无法观测到的场景进行成像<sup>[98-100]</sup>。因此,单像素成像技术对于生物医学诊断、光学遥感和夜视等研究具有重要意义。

单像素成像技术近年来已成为光学领域一个新的研究前沿和热点,它是由计算鬼成像 (Ghost Imaging) 技术<sup>[101]</sup>发展而来。鬼成像通过光场涨落的量子或者经典关联特性来恢复出待测物体的信息<sup>[102, 103]</sup>。这种关联成像只需探测光强信息,因此利用单像素探测器即可实现。研究表明,鬼成像能够有效地抵抗大气湍流等波动带来的干扰,具有很高的信噪比<sup>[104, 105]</sup>。鬼技术与传统成像技术相比还有一个明显的优势,即当物体不在传统成像光路上时,传统的成像技术无能为力,而鬼成像技术能够对其实现探测。此外,得益于成熟的不同频谱响应的单像素光电探测器,鬼成像技术能够对普通面阵相机无法观测到的场景进

行成像, 例如最近澳大利亚科学家首次实现了 X 射线鬼成像<sup>[99]</sup>。

随着对鬼成像物理本质的深入理解, 人们将可编程空间光调制器引入到鬼成像技术中, 极大地简化了鬼成像的装置, 促使计算鬼成像技术得以产生<sup>[106]</sup>。特别是压缩感知 (Compressive sensing) 理论在鬼成像技术中的应用, 在有效降低采样次数的同时实现高质量的成像效果, 使得实时动态成像成为可能<sup>[107, 108]</sup>。鬼成像技术极大地促进了基于单像素探测的成像技术及其应用的发展, 包括核磁共振成像<sup>[109]</sup>、太赫兹成像<sup>[110]</sup>和单像素相机<sup>[111]</sup>等。其中, 三维单像素相机是目前单像素成像的一个研究热点。英国 Glasgow 大学 Miles Padgett 及其合作者在这方面的研究居于世界前沿, 他们相继发明了基于多个点探测器的三维相机<sup>[112]</sup>, 以及基于单像素探测的三维相机<sup>[113]</sup>, 最近还实现了动态单像素三维摄影术<sup>[111]</sup>。

在拓展单像素探测应用的同时, 人们还不断探索新的图像恢复方法以提升单像素成像的性能。2010 年 Ferri 等人提出了差分鬼成像方案, 极大地提高了成像的信噪比<sup>[114]</sup>, 并实现了浑浊介质内部物体的成像<sup>[115]</sup>。为了减少采样次数, 伊朗 Khamoushi 等人提出利用正弦条纹代替传统的随机光场照明实现单像素成像。基于正弦条纹频谱采集方法, 2015 年暨南大学钟金钢课题组首次实现了非直接光信号采集的高质量单像素成像<sup>[116]</sup>。单像素成像不仅能够对单色物体成像, 还能够对彩色物体成像, 英国 Glasgow 大学 Stephen Welsh 等人 2013 年实现了基于三个单像素探测的彩色计算成像<sup>[117]</sup>。国内方面, 清华大学戴琼海课题组最近实现了宽光谱单像素成像技术<sup>[118]</sup>。

综上所述, 单像素成像由可见光波段向不可见光波段发展; 由单色成像向多色成像发展; 由二维成像向三维成像甚至动态三维成像发展。以及最新的研究表明, 单像素成像技术由宏观物体成像向微观成像即单像素显微成像发展, 这将在生物医学检测和诊断等领域具有潜在应用价值。

## 1.7 本文主要研究内容

光镊提供单分子力谱信息, 研究生物大分子的动态过程, 是一种非常有价值的生物学研究手段。本文的第一章, 以光镊技术研究单分子的不同实验方案为主线, 系统阐述了针对多种分子生物学体系进行研究的进展, 为本论文利用光镊研究单分子奠定了基础。第二章重点研究提升纳米级光镊系统的稳定性, 按照单分子研究的需求完成系统控制程序, 实现高效的自动化实验平台。利用生物实验对光镊的纳米级位移、皮牛级外力、电压系数与光阱刚度、溶液环境

粘滞系数等重要参数进行测试。第三章是本研究的重点，用光镊研究 *rpoS* RNA 自抑制茎环的结构，通过对 RNA “力-伸展” 曲线的分析，我们得到了 *rpoS* RNA 自抑制茎环结构被打开的动力学过程，确认了它的 three-way-junction 结构，计算了 RNA 关键核心部分的自由能。通过实验我们发现镁离子明显提高了 RNA 核心部分的结构强度，由此推测镁离子会促使 RNA 结构变得更加紧密并改变茎环的空间取向。光镊实验具有皮牛级外力分辨和纳米级测量精度，为解析 *rpoS* RNA 精细结构和生物学功能分析提供重要的科学依据。第四章是光镊研究驱动蛋白 CENP-E 的动力学特性，根据实验现象预测了 Syntelin 对 CENP-E 的抑制机理。提出了一种光镊研究 CENP-T 与 CENP-W 相互作用强度的方案。第五章提出了一种使用单像素探测器进行物体相位成像的方法，以及使用误差扩散算法优化 Lee 方法的复杂结构光场高保真调制方法。第六章总结了博士期间的主要工作，展望和规划进一步的研究。

## 第 2 章 纳米级光镊系统的稳定性研究

用于研究单分子的光镊系统需要从设计开始考虑精度与稳定性问题。从激光器、探测器等元件的选取，到光镊搭建好后各项指标的标定，如标定位移和光阱刚度测量的精度，再到单分子研究功能的测试，如 DNA 拉伸相变实验测试等。设置探测光与反馈补偿系统漂移等技术是降低噪声提高稳定性的必要措施。

利用光镊研究 RNA 结构功能和马达蛋白行走等是我将要开展的研究内容。RNA 的结构十分精密，一个核酸对打开仅有 1.2 nm 左右的长度；驱动蛋白行走的单步步长为 8.3 nm。因此要想观察纳米尺度的精细过程，需要光镊系统的噪声足够低，即达到纳米或亚纳米量级的探测精度。单分子实验需要多次重复测量来减小热力学涨落的影响，实验经常持续几十分钟到数小时，因此需要引入反馈来补偿系统漂移，将系统漂移控制在 10 nm 以内。为了方便寻找马达蛋白行走附着的微管，需要光镊系统中同时具有荧光或微分干涉相衬 (Differential Interference Contrast, DIC) 成像等功能。因此对现有光镊设备进行优化，达到实验预期的要求是我博士工作的重要内容。

### 2.1 光镊系统设计

设计光镊光路如图 2-1 所示，这是基于奥林帕斯 IX71 倒置显微镜搭建的光镊系统。1064 nm 的光纤激光器 (AFL-1064-40-R-CL) 为捕获光源，提供最高 10W 功率。激光器出射的激光经过偏振分光棱镜 1 后被分成透射的 P 光与反射的 S 光两束，两束激光各经过反射镜之后再由偏振分光棱镜合束，形成双光镊。其中 S 光由压电偏转器 (PI, S-330.2SL) 控制其位置，实现双光镊的相对运动。合束后两束光经扩束系统 1 出射的光斑直径约 7 mm 左右，充满物镜后瞳；这个扩束系统同时也可调节物镜后焦点的轴向位置，即调节光镊的阱位。然后激光经过由 L1 和管镜 (tube lens) 组成的透镜系统，取两个透镜的焦距比为 1:1，这是为了匹配显微镜内置的管镜而设计的。激光经过物镜会聚后形成光镊。为了保证在压电偏转镜偏转时，物镜后瞳处的光斑一直位于物镜后瞳中心，我们将压电偏转镜设置在经过两组透镜系统后的共轭面上，避免了光路偏转而引起光镊光斑的不均匀。



波长为 940 nm 的探测光 (LDM21, Thorlabs 公司) 经过单模光纤准直后输出基模激光。940nm 光经过扩束器 2 后光斑略小于物镜后瞳, 经过两个反射镜与 1064 nm 光束重合, 共轴耦合进显微镜。为了使探测光与捕获光高度重合, 我们用压电偏转系统控制反射镜 BS1, 使两束激光光斑快速对准。探测光被物镜收集后入射到光镊捕获的微球上, 经过微球散射后被聚光镜收集, 最终入射到 PSD (Position Sensitive Detector, 位置敏感探测器探测, DL100-7PCBA3, Pacific Silicon Sensor 公司) 靶面上, 光斑位置与强度被 PSD 测量。PSD 的靶面位于聚光镜后焦面的共轭面处, 实现后焦面探测 (即 BFP 探测<sup>[119-121]</sup>)。样品图像由 CCD 相机 (CoolSNAP HQ2, Photometrics 公司) 或 CMOS 相机 (PL-D752-MU, Pixelink 公司) 采集。

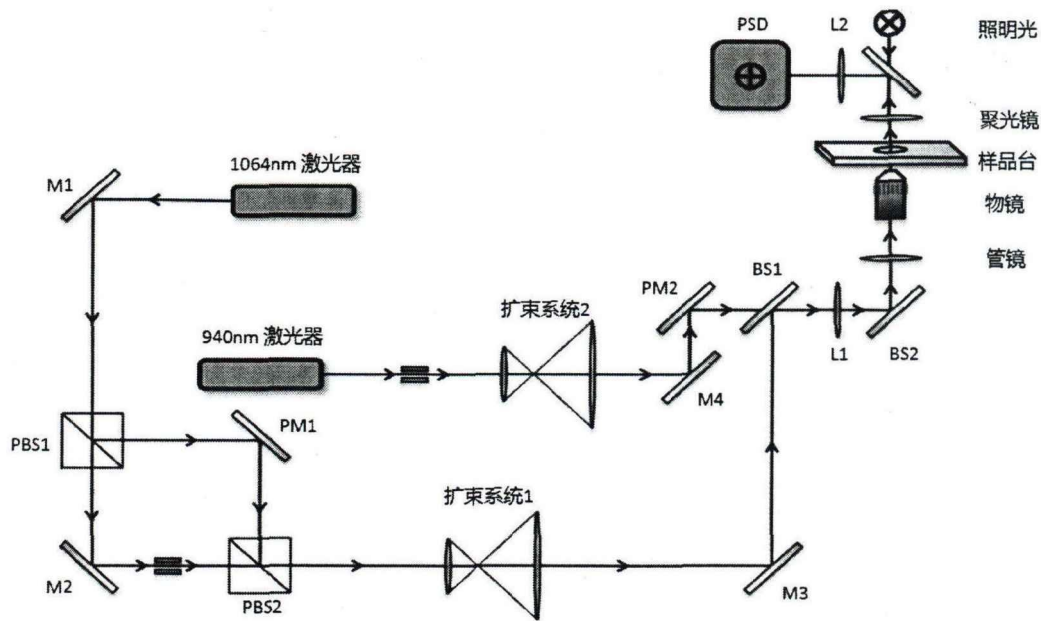


图 2-1 高稳定性单分子光镊光路图。

图中 PBS 为偏振分光棱镜, M1-M4 为反射镜, PM1 与 PM2 为压电偏转镜, BS1 与 BS2 为二色镜, L1-L2 为透镜, PSD 为位置敏感探测器。

样品室的位置大范围调节和精确运动控制由二维手动调节平台 (M545, PI 公司) 加上三维压电平台 (P-545.3R7, PI 公司) 实现。样品台为 PI 公司的三轴压电平台, 移动精度 1 nm, 移动范围每轴均为 200  $\mu\text{m}$ 。PI 公司压电偏转镜的控制精度为 1 nrad, 调节范围为 2 mrad。用 60 倍水浸物镜时, 移动步长为 1.89  $\mu\text{m}$ , 移动范围为 3.78  $\mu\text{m}$ 。

在系统的元件选取上我们进行如下设计:

(1) 由于微球在光镊的谐振势阱中依旧做受限布朗运动, 对于精确位置测

量是一种噪声，我们采取用高激光功率、增大光阱刚度的方法，减小微球在光阱中的受限布朗运动幅度。

(2) 系统中引入优质探测光源，TEC 制冷进行精确温度控制的 940 nm 半导体激光器作为探测光，保证在 100 mW 功率下，光功率波动小于 0.5%。

(3) 捕获物镜常用的是 100 倍油浸物镜，由于溶液的折射率不同于物镜油的折射率，导致距离样品室底面较高位置成像存在相差，光阱刚度也随之快速下降，约 30  $\mu\text{m}$  以上便难以实现捕获。我们采取 60 倍的水浸物镜 (UPLSAPO 60XW, Olympus 公司)，数值孔径为 1.2，在距离样品室底面 280  $\mu\text{m}$  的高度依然能实现稳定捕获，最大光阱刚度可达 1500 pN/ $\mu\text{m}$ 。

(4) 信号探测器选取的是位置敏感探测器 (PSD)。不同于四象限探测器 (QPD)，PSD 是整块靶面，没有中心盲区。PSD 具有 0.5  $\mu\text{m}$  的高分辨率， $\pm 1\%$  的线性度，275 kHz 的带宽与大探测靶面 (1 cm $\times$ 1 cm)。PSD 的输出电压由数据采集卡采集 (PCI-6251, National Instruments 公司)，该采集卡提供多路同时采集功能，每路最快采集速度为 255 kHz。同时采集卡提供进行数模转换，根据需求读取输出数据。与电脑接口为 PXI 插槽，可以通过 Labview 程序直接进行控制与数据采集。

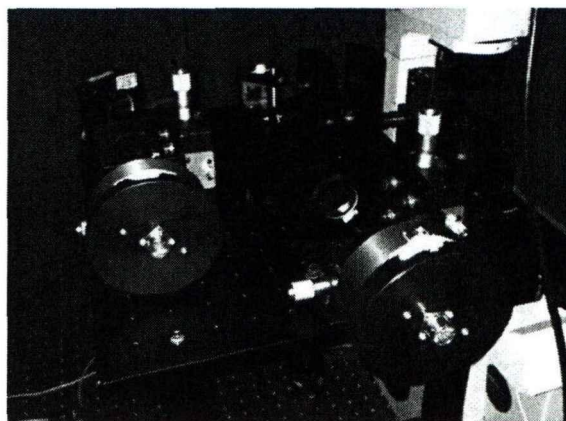


图 2-2 PSD 探测器与探测光路实物图

(5) 相机用于观察样品，需兼顾稳定性和分辨率。如果需要单分子级别荧光成像，一般选择使用 Photometrics 公司的 CoolSNAP HQ2 相机，它在 450 nm~600 nm 的波长范围内拥有超过 60% 的高量子效率，同时具有 0.001 e-/p/s @ -30 $^{\circ}\text{C}$  的超低暗电流。如果需要明场观察与简单的荧光成像，我们选择 Pixelink 公司的无风扇 CMOS 相机，因相机拥有完整的二次开发包 (SDK)，方便使用 Labview 进行二次开发。

### 2.1.1 低噪声探测光路

为了提高 PSD 采集信号的精度,降低激光器光强涨落引起的噪声是非常必要的,因此在传统光镊基础上额外引入了使用高稳定性激光器的探测光路,在保证高光阱刚度的同时降低了信号噪声。

我们比较了 PSD 采集到的 1064 nm 光与 940 nm 光相对二者各自中心的噪声涨落。如图 2-3 (a) 所示,1064 nm 激光功率浮动明显大于 940 nm 激光。考虑到捕获光的功率远高于探测光,我们也计算了二者相对自己的相对电压并进行比较,如图 2-3 (b) 所示。表 1-1 的定量数据同样能得到探测光噪声幅度远小于捕获光的结论。

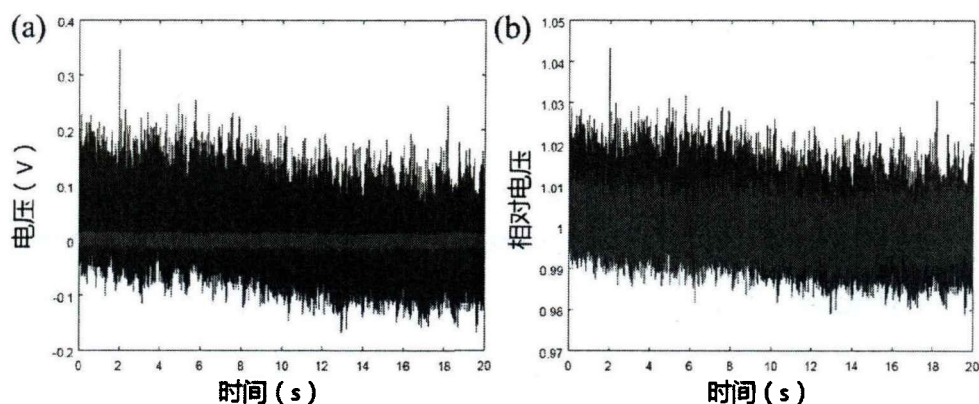


图 2-3 1064 nm 激光与 940 nm 激光功率涨落对比。

(a) 图中横坐标为时间,单位秒,纵坐标为电压,单位伏特,图中蓝线为 1064 nm 捕获光功率,红线为 940 nm 探测光功率。(b) 图为二者的相对电压涨落比较。

表 1-1: 捕获光与探测光功率涨落对比

	X 平均值(V)	Y 平均值(V)	X 标准差(V)	Y 标准差(V)
1064 nm 捕获光	7.9577	8.0035	0.0479	0.0482
940 nm 探测光	1.3253	1.3338	0.0037	0.0036

### 2.1.2 原位电压系数和光阱刚度标定

位移测量是光镊测量力的基础,即测量微球相对于光阱中心偏离的距离。测量位移常用的元件有相机与 PSD/QPD。相机通过拍摄微球图像,计算微球中心位置,得到微球位移信息;PSD 则是在后焦面上探测微球位置变化引起的靶面上光斑位置变化。相机测量方式在标定过每个像素对应的长度后,比较方便

地通过计算得到微球的位置信息，但是受限于相机的采集与数据处理速度，在我们系统中速度为每秒几十帧。使用 60 倍物镜时相机的 1 个像素约 100 nm，所以想通过相机测量纳米量级的微球位移十分困难，而 PSD 的具有高采集速度（255 kHz）与高精度（约 1 nm）。但是 PSD 输出的是电压信号，因此我们需要建立电压信号与微球的位移关系。

根据已有对后焦面成像的推导<sup>[119]</sup>，微球在偏离光阱中心一定距离以内，后焦面上光斑的位移与微球相对光阱中心的位移呈线性关系，我们称为光阱位移线性区（注：微球偏离光阱中心较远后为非线性区。光阱线性区小于光阱位移线性区）。PSD 是线性器件，即光斑位置与输出的电压线性相关，则微球偏离光阱中心的位置与 PSD 输出电压在光阱位移线性区内呈线性关系：

$$X = \beta U_x \quad (2.1)$$

其中  $U_x$  为 PSD 输出  $x$  方向的电压， $X$  为微球在  $x$  方向上的位移， $\beta$  为斜率，称其为 PSD “电压-位移” 转换系数，简称为电压系数。

压电偏转镜的引入不仅可以对准两个焦点，还能实现原位的电压系数标定。其方法是，通过压电偏转镜将探测光斑从微球的一侧扫描到另外一侧，让微球与探测光产生相对位置偏差，等效于微球偏离探测光光阱的中心，扫描曲线结果如图 2-4 所示。两端的平缓区域代表探测光已经离开微球边缘，没有经过微球的折射；中间变化比较陡峭的区域为光镊探测的线性区，斜率为电压系数。截取线性区部分并做拟合，即可原位得到电压系数。

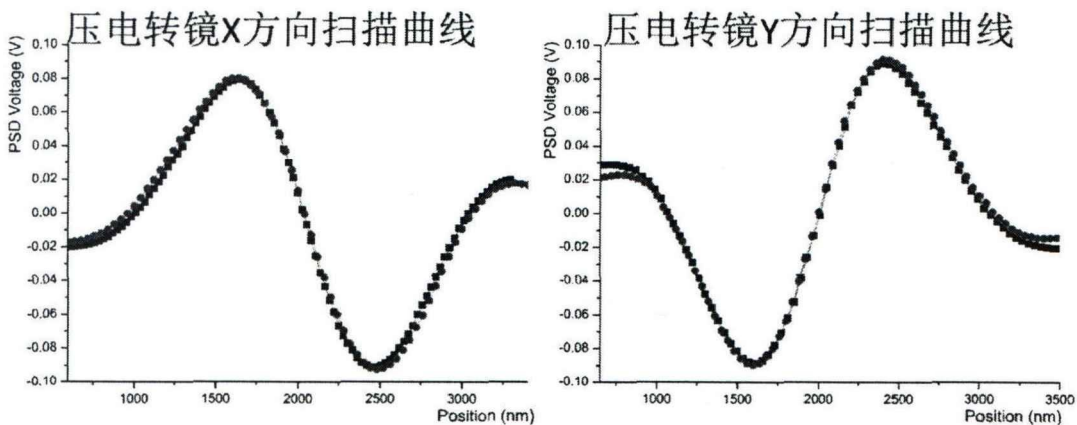


图 2-4 压电偏转镜扫描曲线。

左图为 X 方向的扫描曲线，右图为 Y 方向的扫描曲线。其中横坐标为光斑的位置，纵坐标为位置敏感探测器的电压值。其中红色的曲线是光镊捕获微球，压电转镜扫描曲线；黑色曲线是玻片底面的固定小球，通过压电平移台来改变微球与探测光斑的相

对位置的曲线。

这种原位求解电压系数的方法，需要将压电偏转镜的偏转角度与探测光斑的移动距离相对应，才能标定得到电压系数，即电压系数=压电偏转镜转换系数 ( $\mu\text{rad}/\text{nm}$ ) \* 电压-压电偏转镜偏转的系数 ( $\text{V}/\mu\text{rad}$ )。为了求出压电转镜转换系数，用相机标定了光斑位置随压电偏转镜偏转角的变化。如图 2-5 (a) 所示，先将相机拍摄到的光斑进行二值化处理，然后求解出光斑的中心位置。通过改变压电偏转镜的偏转角进行扫描，得到光斑位置随偏转角的变化，曲线如图 2-5 (b) 所示，对曲线进行线性拟合，得到压电偏转镜转换系数 ( $\mu\text{rad}/\text{nm}$ )。

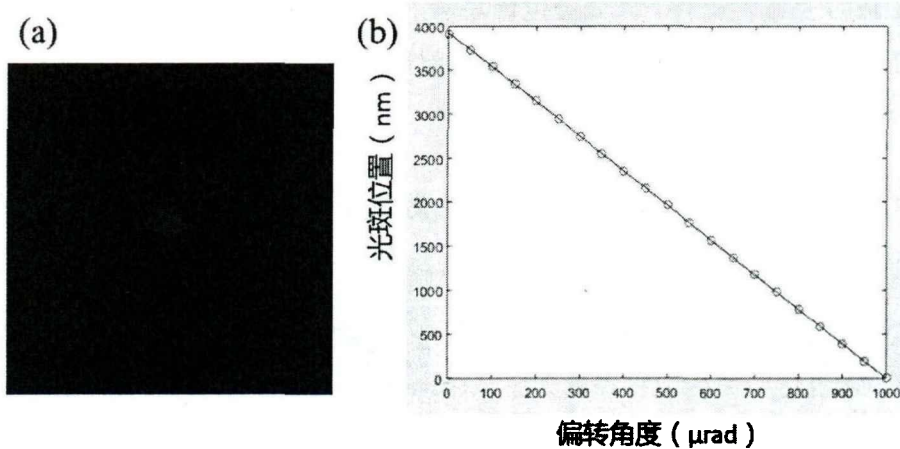


图 2-5 压电偏转镜转换系数标定曲线。

(a) 图为相机拍摄的二值化处理后的探测光斑图像，(b) 图为压电偏转镜转换系数标定曲线，其中横坐标为压电偏转镜偏转角度，单位微弧度，纵坐标为光斑位置变化，单位纳米。这里已经使用标定过的相机像素大小，所以给出的值直接为距离。

提取出压电偏转镜扫描中的线性区进行线性拟合，结果如图 2-6 (a) 所示，线性度良好。利用此电压-压电偏转镜偏转系数 ( $\text{V}/\mu\text{rad}$ ) 乘以压电偏转镜转换系数 ( $\mu\text{rad}/\text{nm}$ ) 得到电压系数。当在未捕获微球情况下，压电偏转镜扫描得到图 2-6 (b) 所示的 PSD 电压曲线。在同样偏转 100 微弧度下，存在微球时电压变化约 0.1 V，而没有微球时仅有约 0.001 V。这说明偏转探测光在 PSD 上产生的光斑位置移动是可以忽略不计的，PSD 信号反映了探测光斑与微球的相对位置。良好结果的主要得益于压电偏转镜摆放在物镜后焦面的共轭面位置，同时采用后焦面探测的方式。

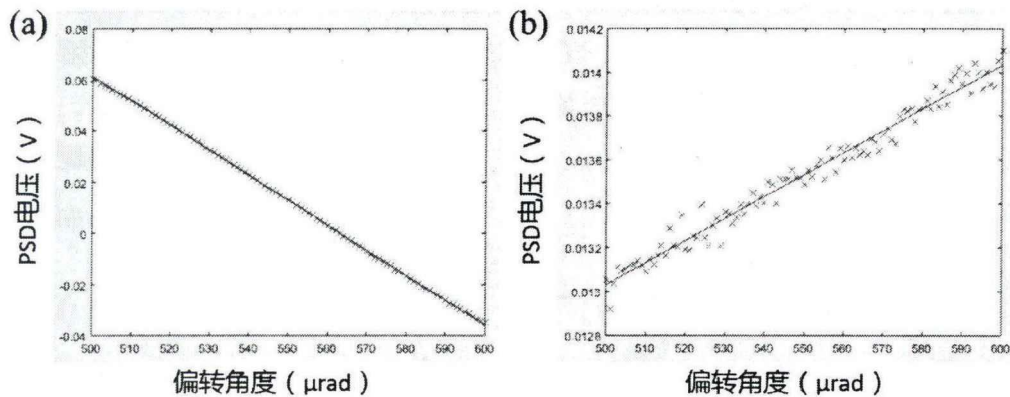


图 2-6 PSD 电压随压电偏转镜偏转角度变化曲线。

(a) 图为光镊捕获微球时采集的电压变化曲线，横坐标为压电偏转镜偏转角度，单位为微弧度，纵坐标为 PSD 测量得到的电压，单位伏特。(b) 图为不存在捕获微球时采集的电压变化曲线。

为了验证测量得到的电压系数是否正确，将捕获的微球粘连到样品室底面上，然后关闭捕获光。利用压电平台改变微球位置，使探测光与微球产生相对位置变化，进行了类似的扫描过程，得到数据如图 2-4 中黑色曲线所示。结果与转镜扫描几乎一致，这说明原位电压系数探测方法的可行性与正确性。同样，将压电平台扫描曲线中间线性区数据截取出来，进行线性拟合，结果如图 2-7 所示，曲线中间部分线性度良好，但因为压电平台移动精度（约 1 nm）低于压电偏转镜的移动精度（约 2 pm），所以数据点数量略少于图 2-6 (a)。

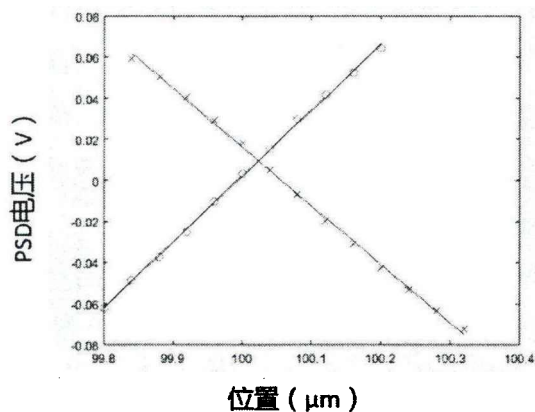


图 2-7 压电平台线性区扫描曲线。

图中两种数据点分别代表 X、Y 方向线性区内 PSD 采集到的数据，其中横坐标为光阱位置，单位  $\mu\text{m}$ ，纵坐标为 PSD 在扫描方向采集的电压，蓝线与红线为对应的拟合曲线，曲线斜率即为 X、Y 方向电压系数。

在引入探测光、实现快速的原位电压系数标定之后，就可以方便地进行光阱刚度的标定<sup>[122]</sup>。功率谱分析方法与均方位移（MSD）方法标定结果如图 2-8 (a) 与 (b) 所示，两种方法均有较好的拟合效果。

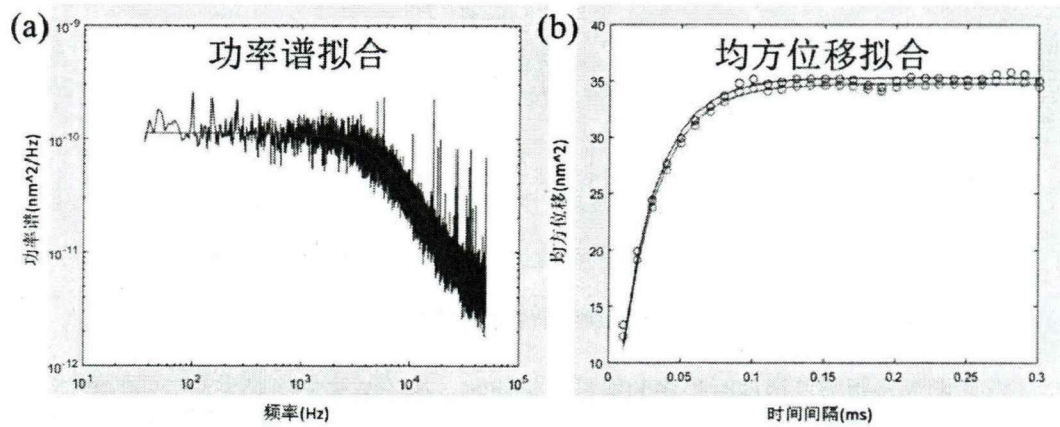


图 2-8 功率谱与均方位移曲线。

(a) 图横坐标是频率，纵坐标是功率谱变换后的数据。其中蓝色为功率谱曲线，红色为曲线拟合的结果。(b) 图片横坐标是时间间隔，纵坐标是对应的均方位移。红色与蓝色的数据点分别表示 X 与 Y 方向的均方位移，及其数据的拟合曲线。

有了电压系数与光阱刚度可方便地求出微球在光阱中的扩散系数，即测量溶液微区的粘滞系数，具体测量方法见本章 2.2.2 节。

### 2.1.3 反馈补偿系统的漂移

机械系统不可避免有内部的应力释放与重力作用下沉降的问题，这种漂移对于纳米量级测量实验是致命的，所以采取反馈补偿系统漂移来保障系统长时间稳定是必要的。在光镊实验方案中，固定在样品室底面的微球与样品室保持相对静止，光镊的位置则是由物镜位置决定，因此保证样品室位置与物镜位置的相对稳定就可以达到稳定系统的目的。

我们采用对固定微球进行位置追踪的方法，测量样品室与物镜间的相对漂移。首先寻找并追踪一个粘连在样品室底面微球的三维位置变化，如图 2-9 (a) 中所示<sup>[123]</sup>。水平方向追踪方法常见的有二值化寻找中心、求解灰度中心或自相关等，我们采用计算较快、结果稳定的灰度中心方法。该方法需先将微球所在区域截取出来，进行二值化处理找到微球边缘。然后求解微球边缘范围内微球的灰度中心：

$$x_0 = \frac{\sum_j^m \sum_i^n x_{i,j} f_{i,j}}{\sum_j^m \sum_i^n f_{i,j}},$$

$$y_0 = \frac{\sum_j^m \sum_i^n y_{i,j} f_{i,j}}{\sum_j^m \sum_i^n f_{i,j}},$$
(2.2)

其中 $(x_{i,j}, y_{i,j})$ 为某一个像素的位置， $f_{i,j}$ 为该像素的灰度值， $(x_0, y_0)$ 即为微球的灰度中心，微球边缘以外的部分认为灰度为0。

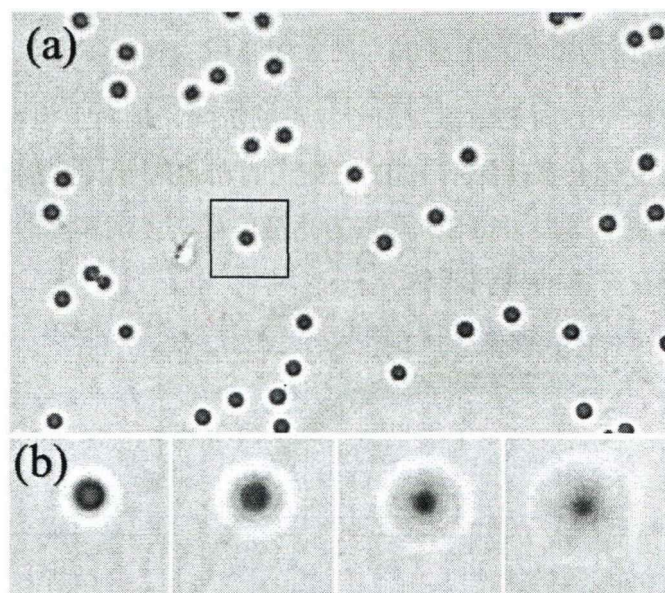


图 2-9 微球图像识别。

(a) 图为样品室底面的微球，(b) 图为目标微球渐渐离焦时的像的变化。

通过公式(2.2)计算出微球的灰度中心，追踪灰度中心随时间的变化得到平台的漂移情况如图 2-10 所示，可见在约 20 分钟，X、Y 方向均约有  $1.5 \mu\text{m}$  的系统漂移，这对于纳米量级的测量影响很大。



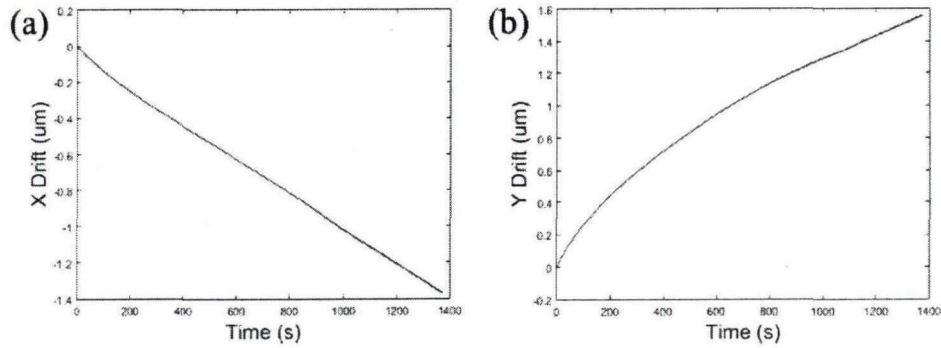


图 2-10 微球追踪法测量系统漂移。

(a)、(b) 图分别为微球追踪法测量得到的样品室在 X、Y 方向漂移曲线，横坐标为时间，单位秒，纵坐标为漂移距离，单位微米。

系统不仅会有水平方向上漂移，随着物镜的沉降，轴向上也存在漂移。由于微球在轴向位置变化会直接影响 PSD 采集到的光强信号，使用探测光对准粘底微球，由此监测到图 2-11 中 PSD 采集的光强信号，发现其随时间有明显的变化，说明系统存在严重的轴向漂移。

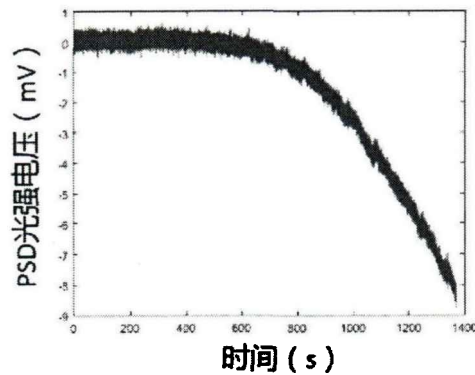


图 2-11 PSD 采集样品室轴向漂移。

其中横坐标为时间，单位秒，纵坐标为 PSD 采集到的光强通道电压信号，单位毫伏。因为 PSD 靶面上光强信息对微球的轴向位置非常敏感，所以该曲线代表了样品室在轴向上的漂移。

为了补偿系统的漂移，需要通过压电平台进行反馈。水平方向的反馈借助于追踪微球灰度中心方法计算出漂移量的大小，将漂移的距离通过压电平台移动进行补偿即可。轴向则需要一个稳定的方法来实现。图 2-9 (b) 展示了微球在轴向离焦时成像的变化。在微球处于物镜焦面时，成像边缘最锐利；随着离焦越来越远，微球轮廓变大，成像也越来越模糊。所以我们考虑了两种方案进

行轴向漂移的反馈，一种是图像信息熵法，一种是等效半径法。

图像信息熵反映了像素的混乱程度，成像越清晰，图像混乱度越低，信息熵也越低；反之亦然。图像信息熵定义为：

$$e = \sum_0^{255} p_i \log(p_i), \quad (2.3)$$

其中  $p_i$  是灰度值为  $i$  的出现概率，因为相机采集的是 8 位图像，因此只有 0~255 种灰度值。计算出每种灰度出现的概率，并按照公式(2.3)计算得到图像的信息熵。图 2-12 表明，随着微球的轴向移动，微球会先离焦、成像清晰、再离焦，相应地信息熵也呈现先下降再升高的曲线形状，这与信息熵的意义吻合。容易得知，当成像最清晰时，信息熵最低，如果此时微球在轴向上产生微小扰动，无论升高还是降低，微球的信息熵均会升高，这样无法判断微球在轴向上的运动方向，也就无法进行相应的补偿。

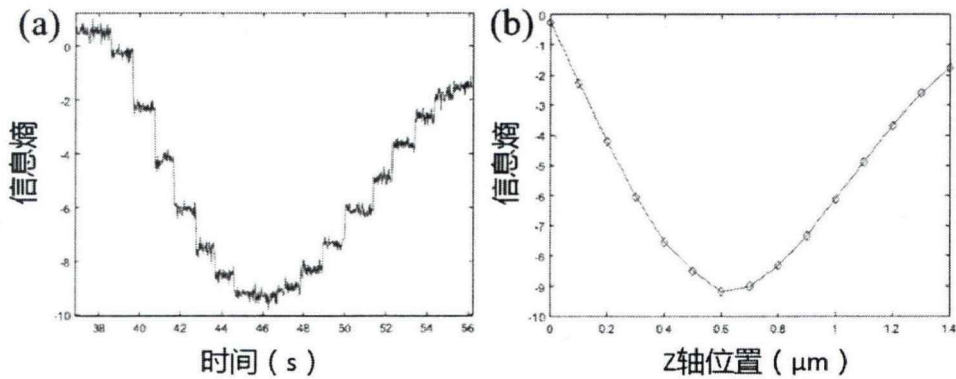


图 2-12 信息熵法微球轴向位置校准曲线。

(a) 图为控制压电平台以 100 nm 步距在轴向移动，得到信息熵法微球轴向位置校准曲线，其中横坐标为时间，单位秒，纵坐标为信息熵。(b) 图为将 (a) 图进行数据处理，横坐标转换为轴向位置后的微球轴向位置校准曲线，其横坐标为微球的 Z 轴位置，单位微米，纵坐标为信息熵。

等效半径法是通过计算微球等效半径来判断微球轴向位置的方法。先标定不同离焦情况下等效半径变化曲线，测得等效半径，然后反解出微球轴向位置，对轴向漂移进行矫正。等效半径定义为：

$$R_{eff} = \frac{\sum_n^N f_n \sqrt{(x_n - x_0)^2 + (y_n - y_0)^2}}{\sum_n^N f_n}, \quad (2.4)$$

等效半径代表了微球影像中各个像素点相对于微球中心距离的灰度加权平均值，其中  $f_n$  为第  $n$  个像素点的灰度值， $x_n$ 、 $y_n$  为每个像素点的坐标， $x_0$ 、 $y_0$  为微球图像灰度中心的坐标，对所有  $N$  个像素位置到灰度中心的距离进行灰度加权平均即可得到微球等效半径  $R_{eff}$ 。

如图 2-13 所示，压电平台以 100 nm 的步长逐步改变微球的轴向位置，微球成像从离焦到成像清晰再到离焦的过程中，等效半径单调增大；但是当离焦较远时，等效半径值则对轴向位置不敏感了。考虑到反馈工作范围处于等效半径有效范围内，且在有效范围中，等效半径变化与平台纵向位置近似呈线性关系，所以可以用等效半径来计算微球与焦平面之间纵向距离，从而用于反馈补偿系统轴向漂移。

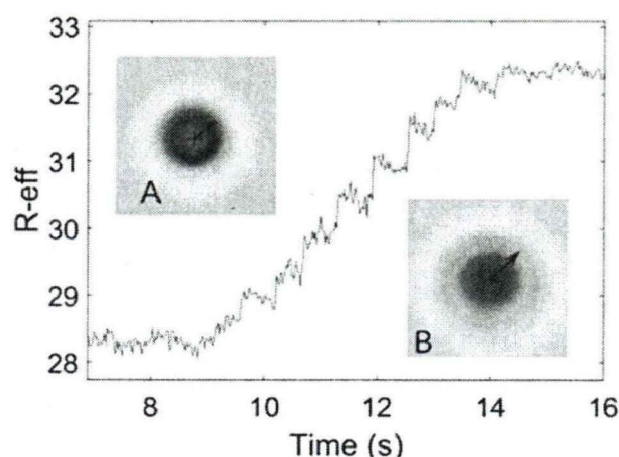


图 2-13 参考微球等效半径的计算与测试。

A、B 为不同离焦状态下的参考微球图像。红色箭头表示等效半径。曲线为压电平台以 100 nm 步长、0.5 秒时间间隔向上运动时，计算出的等效半径。纵轴为等效半径值，横轴为时间。

采取实时反馈法有效补偿了系统漂移，降低了噪声。图 2-14 展示了用 PSD 探测固定微球测试的反馈效果，图中红线所示为无反馈补偿，蓝线所示为有反馈补偿。图 2-13 (a) 为 PSD 在 X、Y、Z 方向采集的原始数据，对原始数据做平滑滤波降低电路固有噪声后，结果如图 2-14 (b) 图所示。无反馈补偿的情况，15 分钟内 X、Y 方向有 100~200 nm 的系统漂移，Z 轴方向的漂移达到了近 400 nm。然而开启反馈补偿后，系统在 X、Y、Z 方向的最大漂移值为 3.2 nm、4.9 nm 和 9.0 nm，平台位置的标准差为 0.79 nm、2.79 nm 和 1.70 nm，可见引入反馈来补偿系统漂移，系统稳定性得到提升。小于 3 nm 的系统稳定性保证了单分子实验的可信度与精度，对于 *rpoS* RNA 拉伸实验、马达蛋白行走测量实验都是非

常必要的。

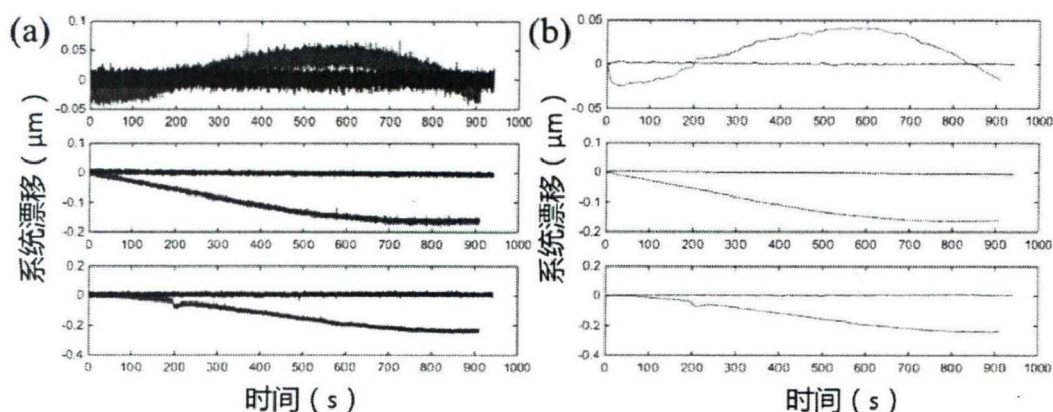


图 2-14 系统漂移反馈测试曲线。

(a) 图为 X、Y、Z 三轴系统的漂移测试曲线，图中横坐标为时间，单位秒，纵坐标为 PSD 采集到的电压，单位伏特。其中红线为无反馈的平台漂移曲线，蓝线为有漂移反馈后测到的平台漂移曲线。(b) 图为 (a) 图滤波过后的数据曲线。

## 2.2 生物实验测试

光镊研究生物实验，特别是测量单分子力谱的光镊系统中，需要针对单分子实验研究进行相关的基础实验和参数测定。目前还尚未有关于光镊仪器的国际标准，如何检验光镊仪器所测的数据符合要求，在该领域普遍方法是用光镊测量 DNA 拉伸相变曲线中 65 pN 左右的平台进行验证。除此之外，我们还设计了溶液粘滞系数测量的方法进行了验证，以及对细胞的功率谱分析。

### 2.2.1 DNA 拉伸相变曲线

在光镊研究单分子领域，普遍采用对 DNA 拉伸相变曲线来检验系统的可信度，我们使用了两种方法进行拉伸测试。压电平台拉伸 DNA 如图 2-15 (a) 所示，DNA 连接在两微球间，压电平台带着 A 球远离/靠近 B 球，实现对 DNA 的拉伸与回复。用压电偏转镜拉伸 DNA 如图 2-15 (b) 所示，压电偏转镜操控光镊移动 B 球进行 DNA 拉伸与回复。实验录像截图如图 2-15 (c) 所示。

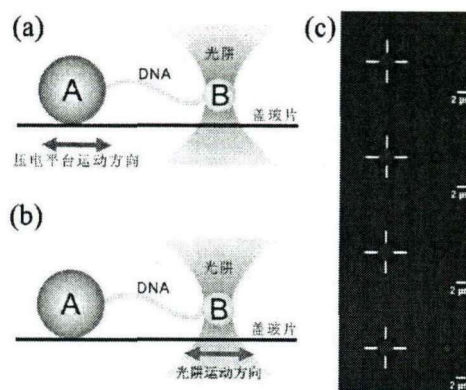


图 2-15 双链 DNA 过拉相变实验示意图。

(a) 图为压电平台拉伸，(b) 图为压电偏转镜拉伸，(c) 图为实验录像截图。

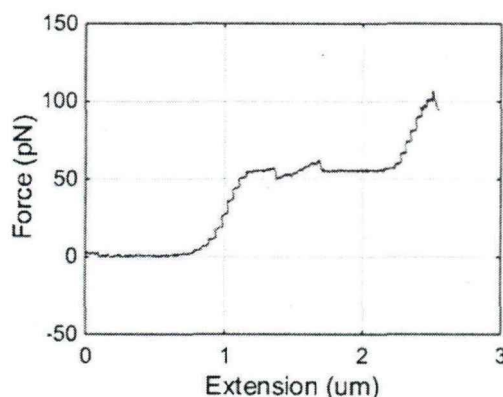


图 2-16 双链 DNA 过拉相变实验曲线。

图中横坐标为拉伸长度，单位为  $\mu\text{m}$ ，纵坐标为外力，单位  $\text{pN}$ 。

我们实验用的是约 5000 个碱基对 (Base Pair, BP) 的双链  $\lambda$ -DNA，长度约为  $1.67 \mu\text{m}$ 。利用生物素与链霉亲和素之间的特异性偶联，将 DNA 两端连接在两个表面修饰有链霉亲和素的微球之间。因为生物素与链霉亲和素的结合很强，能在  $100 \text{ pN}$  外力下保持不断开，适合于 DNA 的相变拉伸实验。

测量得到双链 DNA 过拉相变实验曲线如图 2-16 所示，在  $65 \text{ pN}$  处的平台，即为 DNA 相变区。度过相变区后继续拉伸，在大约  $100 \text{ pN}$  处，两端的生物素-链霉亲和素偶联因承受不了更大的力而断裂。DNA 力谱表明我们对光阱刚度与电压系数的标定是有效的，光镊系统可用于单分子测量。

### 2.2.2 溶液粘滞系数测量

溶液粘滞系数表征了溶液性质，对于复杂的生物学体系，溶液环境的粘弹性本身就是待研究的问题。我们采用扫描探测光方法能原位测量溶液微区的粘滞系数，并在已知粘滞系数的溶液中进行测量，将得到结果与标准测量结果相比较，证明了扫描探测光方法原位测量溶液微区粘滞系数的可行性。

实验方法：先用光镊捕获一个直径已知的微球，用扫描探测光方法求得电压系数 $\beta$ ，测量得到微球在光阱中做受限布朗运动的位移 $x(t)$ 。对采集到的位移做功率谱分析，其功率谱分布应满足洛伦兹分布：

$$P_x(f) = |\tilde{X}(f)|^2 = \frac{D/(2\pi^2)}{f_{c,x}^2 + f^2}, \quad (2.5)$$

其中 $f_{c,x} = \frac{k_x}{2\pi\gamma}$ 为转角频率， $D$ 是扩散系数。 $\gamma$ 是摩擦系数，物体为球形时

可写为 $\gamma = 6\pi\eta a$ ，其中 $\eta$ 是介质的粘滞系数， $a$ 是微球的半径。因此可以得到：

$$D = \frac{k_B T}{\gamma} = \frac{k_B T}{6\pi\eta a}, \quad (2.6)$$

用功率谱拟合得到扩散系数便能求解出粘滞系数 $\eta$ 。

实验测量了不同比例甘油水溶液的粘滞系数，结果如图2-17所示。图中的数据点用圆圈符号标记，数据的平均值与标准差以误差棒的形式呈现，X方向、Y方向与全部数据计算结果分别用红色、蓝色与黑色表示。可以看出，X与Y方向的数据非常接近，这说明光阱是各向同性的；数据的标准差很小，表明系统的稳定性高。图中虚线为20°C下粘滞系数的标准数据曲线，实验温度为21°C，由此得到测量的结果与标准粘滞系数基本相同，再次证明光镊系统标定是准确的。

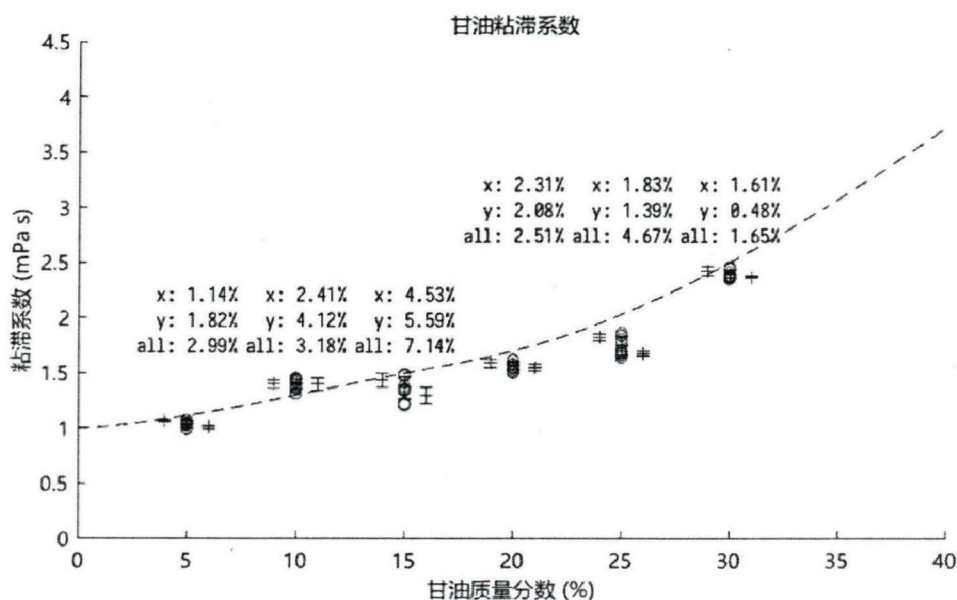


图 2-17 甘油水溶液粘滞系数测量结果。

图中横坐标为甘油水溶液甘油的质量分数，纵坐标为粘滞系数。每个不同的质量分数分别计算了在 X 方向（红色）与 Y 方向（蓝色）上的粘滞系数结果，用圆圈表示数据点。误差棒为数据对应的平均值与标准差，总的平均值与标准差用黑线表示，每个方向各自的平均值与标准差则为了方便观察放置在数据点两侧。图中虚线为 20°C 下粘滞系数的标准数据曲线，数值为每组数据的相对误差（标准差除以均值）。

由于甘油水溶液质量分数差异会影响溶液的粘滞系数与折射率。当用水浸物镜时，样品室内折射率与水的折射率不同，直接体现在电压系数上。电压系数的倒数与微球距离样品室高度呈线性关系，如图 2-18 (a) 所示，微球距离样品室底面越高，电压系数倒数越低。我们将线性拟合的斜率提取出来（斜率代表溶液折射率的信息），然后画出斜率随甘油水溶液质量分数变化曲线，如图 2-18 (b) 所示。发现斜率随甘油质量分数单调变化，与溶液折射率变化趋势相同，这个结果提示我们，通过电压系数测量溶液折射率具有可行性。

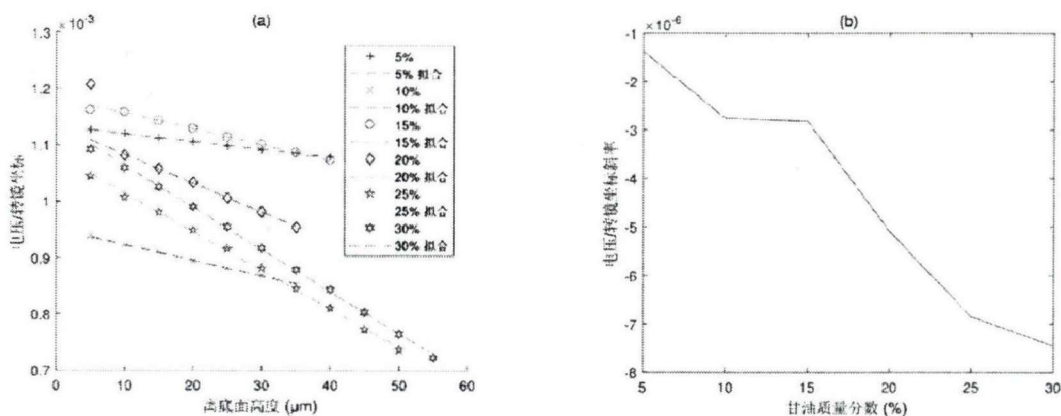


图 2-18 电压系数倒数随微球距离样品室底面高度变化曲线。

(a) 展示了不同质量分数甘油水溶液中，电压系数的倒数随微球距离样品室底面高度的变化曲线，图中横坐标为微球距离样品室底面高度，单位  $\mu\text{m}$ ，纵坐标为电压系数的倒数。(b) 图横坐标为甘油水溶液的质量分数，纵坐标为 (a) 图中每个甘油水溶液质量分数下，电压系数倒数线性拟合的斜率。

### 2.2.3 细胞的功率谱标定

在光镊系统中通常使用形状规则的标准微球作为标定物体，因为细胞的形状不规则，并且在光镊中能自由旋转，因此不适合用功率谱进行标定。我们使用一定速度的流场对细胞进行冲刷，细胞的各向异性会使它的随机旋转大大减弱。然后通过扫描探测光寻找到电压曲线中线性区域的中心（不一定位于细胞中心），然后采集功率谱数据进行细胞的标定。流场的引入与探测光的扫描使光镊对细胞的标定成为可能。

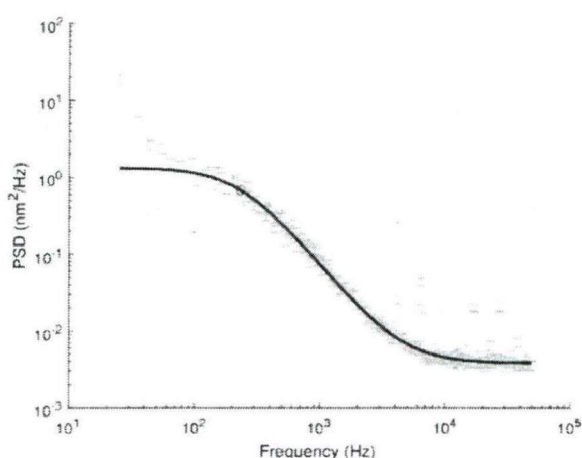


图 2-19 细胞的功率谱曲线。

图中误差棒为拟合所用数据点与误差估计，蓝线为功率谱拟合曲线，图中红色圆圈代表着转角频率  $f_c$ 。

对细胞进行光阱刚度标定结果如图 2-19 所示，功率谱数据有很好的拟合效果。由于流场与细胞自身的不稳定性使得功率谱低频部分有较高的噪声，但并没有影响功率谱拟合。通过在功率谱拟合曲线中加入一项常数作为拟合参数，用于表征系统的白噪声，能得到更好的拟合效果。

## 2.3 样品室底面修饰

样品底面修饰是光镊研究生物实验的重要环节，不同实验精度对样品池底



面的要求也不同。例如单分子实验在保证样品室的底面平整、表面无残留杂质的情况下，有时需要带有电性的基团或分子，使微球不容易粘连；有时需要一些大分子（如微管）能牢牢地粘连不脱落；有时则二者同时需要。为此，我们开发了一整套样品室玻片清洗与修饰方法。

（1）玻片表面清洁。样品室的底面不清洁，会导致因静电相互作用或表面能而粘附小分子，同时也会对成像与光镊光场产生影响，严重时一些杂质进入光阱之中，会给实验测量造成巨大误差。所以在制作样品室之前，需要对玻片进行严格的清洗，彻底去除玻璃表面的无机杂质和有机杂质。

（2）玻片表面电性修饰。一般情况蛋白质都是带有电性的，我们可以利用蛋白质的电性使其吸附在样品室表面。即使蛋白不表现出电性或者电性与样品室表面电性相同，也能通过与表面电性相反的基团吸附在表面上。常用方法是将多聚赖氨酸涂在盖玻片的表面，利用其正电性吸附带有电性的蛋白分子，将蛋白固定在样品室底面上。然而这种固定方法对分子选择性差，几乎所有蛋白分子都会被吸附在表面。如果缓冲液中存在带有强电性的物质（例如酪蛋白、牛血清白蛋白等），他们会中和掉多聚赖氨酸的电性，使固定效果减弱。

（3）玻片表面共价键修饰<sup>[124]</sup>。我们采取了一种可以将微管或者带有蛋白的微球以共价键形式连接在样品室底面的方法，并将该方法应用到了光镊研究单分子实验体系中。具体修饰流程如下：

- 1) 将盖玻片清洗干净，用等离子体对表面进行轰击，得到含有羟基基团的表面。
- 2) 将盖玻片放入到 APTES（3-氨丙基三乙氧基硅烷）水溶液中。APTES 遇水后，三乙氧基会水解为羟基。该产物会与盖玻片表面的羟基反应而偶联在盖玻片表面，使盖玻片表面裸露大量氨基。
- 3) （在样品室使用前）加入戊二醛与样品室底面氨基发生脱水反应，从而将戊二醛连接在样品室的底面上，暴露出性质活跃的醛基。
- 4) 将样品室内的戊二醛冲洗干净后，加入待偶联样品（微管或带有蛋白的微球），在 4℃ 下孵育 30 分钟。样品上的氨基、羧基等基团非常容易与活跃的醛基产生共价键偶联，从而将样品以共价键形式连接在了样品室底面。

（4）样品室底面封闭。如果需要后面加入的样品不再轻易地粘连在样品室底面上，需要随后向样品室内加入封闭缓冲液，如含有酪蛋白（casein）或牛血清白蛋白（BSA）的溶液。溶液中过量的 casein 或 BSA 会以共价键形式偶联在样品室底面上，消灭多余的醛基；同时 casein 与 BSA 均带有强电性，玻片底面

的封闭剂会与悬浮微球上的封闭剂相互排斥，保证悬浮微球不易粘连在底面上。

玻片表面共价键修饰的优势在于可以将需要粘底的微球牢牢偶联在样品室表面，需要悬浮的微球也不容易粘连在样品室底面。如果使用表面电性修饰，封闭剂的加入会中和样品室底面电性，从而出现微管一端漂浮起来或者微球晃动的情況。

## 2.4 光镊系统控制程序设计

对光镊系统的重要功能实现自动控制，将一定程度避免系统噪声、提高系统测量精度和工作效率，同时能开发出新功能，为使用提供便利。

考虑到光镊控制程序要实现的功能很多，也比较复杂，所以一个优秀的程序框架既能保证任务执行的高效性与便捷性，又能保持程序的稳定性，减少程序出错的概率。经过多次摸索与改进，现在使用的程序构架示意图如图 2-20 (a) 所示。因为 PSD 只有在上一个任务结束后才能被再次调用，否则就会报错，因此需要将 PSD 的监控模块、探底模块、标定模块、拉伸模块与恒力模块用状态机构架组合在一起，保证不出现同时调用的情况。无论执行哪个模块，都希望能实时操控压电平台与压电偏转镜来控制样品室位置与光镊位置，所以在状态机构架之外，存在有与其并行的手动操控模块。系统中还耦合有借助压电平台反馈来补偿系统漂移的部分，该功能可以人为选取开启或关闭。考虑到在监视模块、拉伸模块与恒力模块中都会用到该功能，所以也将它与状态机并行。当反馈模块开启后，应避免移动压电平台，这会对反馈产生影响。

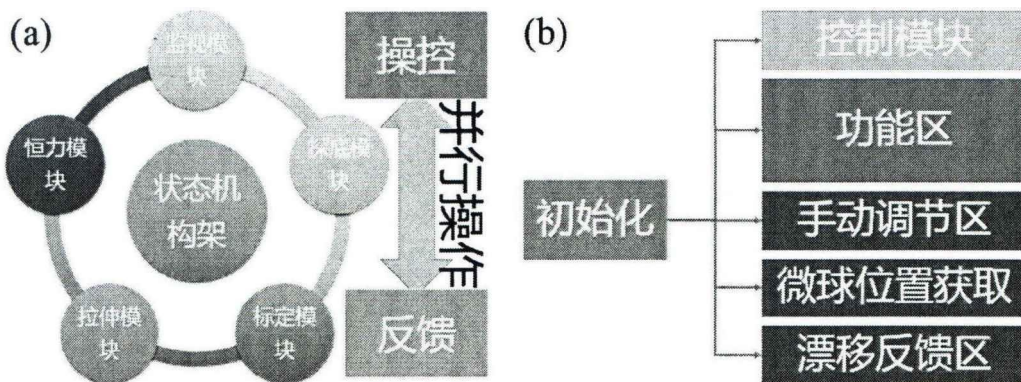


图 2-20 光镊控制程序结构示意图。

(a) 图为控制程序结构的设计思路。(b) 图为程序编写框架。

控制程序编写结构如图 2-20 (b) 所示。首先初始化需要调用的设备，然后

程序分成 5 个部分并行工作。控制模块用于修改功能区中状态机的状态指示参数，切换功能区执行的状态；同时该模块也会修改其它区域的运行状态，例如控制微球位置获取区与漂移反馈区是否暂停工作。功能区是程序核心部分，用于实现实验中的各种功能，用状态机结构实现功能切换。手动调节区用于手动控制压电平台与压电偏转镜的位置；微球位置获取区用于获取追踪的微球三维位置；而漂移反馈区利用获取的微球三维位置，反馈补偿系统的机械漂移。

### 2.5 本章小结

本章针对如何提高纳米级光镊稳定性进行了研究，在光镊系统中引入探测光路，实现了在保证高光阱刚度的同时，降低了 PSD 采集信号由激光功率涨落引起的噪声；漂移反馈补偿大大减小了系统的漂移，使我们能进行长时间的单分子实验。光镊稳定性提高有助于捕捉单分子力谱中的精细过程与保持实验数据的一致性。用 DNA 过拉伸实验、粘滞系数测量实验与细胞标定实验验证了标定的正确性与系统的稳定性，证明该系统适合研究单分子课题。针对我们要研究的单分子课题，编写了系统自动化控制程序，提高实验效率的同时，降低人为因素对实验的影响，得到更精确、更稳定的实验结果。单分子课题研究内容将在第三章、第四章中详细介绍。

### 第3章 光镊研究 rpoS RNA 自抑制茎环结构

在一般情况下, *rpoS* RNA 处于抑制状态, 其 5' UTR 上的 SD 序列被折叠在双螺旋内部, 无法与核糖体结合。在应激条件下, 细菌会转录 sRNA。sRNA 在 Hfq 蛋白的帮助下与 UTR 上特定区域互补配对, 通过竞争的方式使 SD 区域暴露出来, 从而解除自抑制机制。因此自抑制茎环空间结构以及如何招募 sRNA 开启翻译过程是人们非常关心的问题, 于是我们使用光镊对 *rpoS* RNA 自抑制茎环进行拉伸, 通过拉伸得到的“力-伸展”曲线分析自抑制茎环的结构, 并进一步研究了镁离子对自抑制茎环结构核心区域的影响。

#### 3.1 拉伸实验方案

我们采取单光镊法研究 *rpoS* RNA 二级结构, 设计方案如图 3-1 所示。图中 A 球为表面修饰有地高辛抗体的 2  $\mu\text{m}$  聚苯乙烯微球, 通过共价键偶联的方式连接在玻片底面。B 球为表面修饰有链霉亲和素的 1  $\mu\text{m}$  聚苯乙烯微球。*rpoS* RNA UTR 部分除了待研究自抑制茎环的 87 个核苷酸外, 其它区域与互补配对的单链 DNA 杂交形成双链作为拉伸手柄。两侧手柄末端分别修饰有地高辛(digoxin)与生物素(biotin), 通过特异性偶联连接在两个微球上。通过光镊捕获的微球对 RNA 施加外力, 并实时测量施加外力大小, 逐渐增大外力直至自抑制茎环内部结构打开。

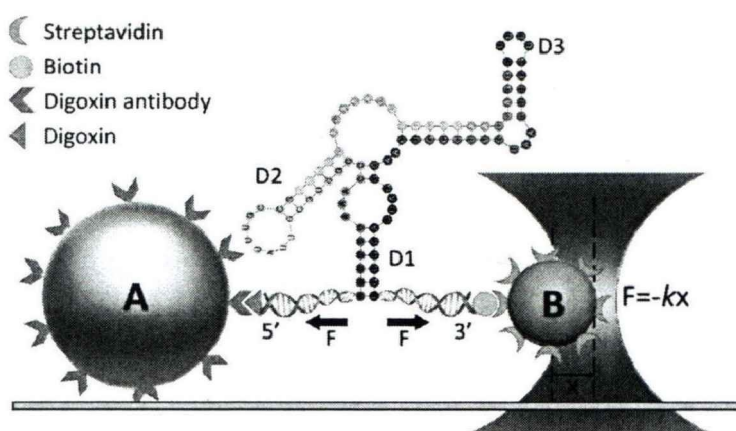


图 3-1 光镊拉伸 *rpoS* RNA 实验方案。

图中 A 球为表面修饰有地高辛抗体的 2  $\mu\text{m}$  聚苯乙烯微球, 通过共价键偶联的方式连接在玻片底面。B 球为表面修饰有链霉亲和素的 1  $\mu\text{m}$  聚苯乙烯微球。87 个核苷

酸的自抑制茎环结构用彩色标识为待拉伸的功能区域；D1、D2 和 D3 为 three-way-junction 的三个茎环。RNA 的两端与 DNA 杂交形成双链作为拉伸手柄，再通过两段手柄末端修饰的地高辛与生物素分别与 A、B 球上的地高辛抗体、链霉亲和素连接。黑色箭头指示 RNA 受力方向；X 为 B 球偏离光阱中心距离， $F = -kX$  为光镊施加在 B 球上的力。

为了实现图 3-1 描述的拉伸过程，得到可信度高的实验结果，我们需要通过 Labview 编写控制程序，完成如下几项功能：

**连接试探：**连接试探的流程如图 3-2 所示，目的是判断 A 和 B 球是否连接。首先让两个微球靠近或轻微接触，使 B 球上的 RNA 分子带有地高辛抗体的一端有可能与修饰有地高辛抗体的粘底 A 球相连。在靠近 1~5 秒后，通过光镊牵拉 B 球远离 A 球一段距离（略小于分子总长），判断 B 球上所受的力。如果所受外力远大于外力的随机涨落，证明两个微球之间产生了有效的连接，可以进行下一步的拉伸实验；反之则需要重新进行连接试探。

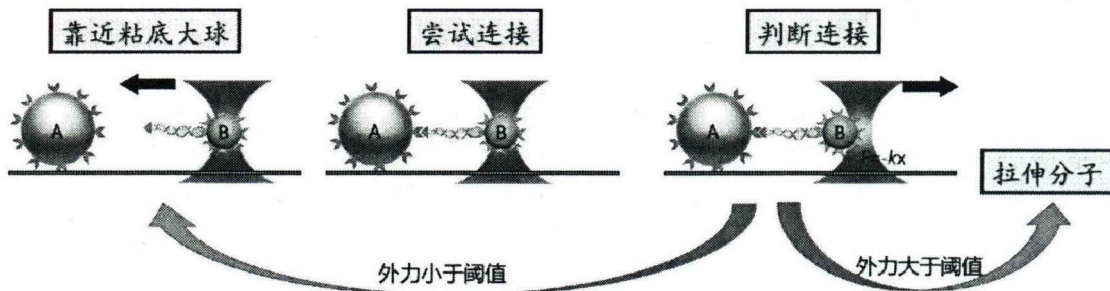


图 3-2 连接试探流程图

**拉伸/回复分子：**控制压电偏转镜拉伸/回复分子流程如图 3-3 所示。当连接试探确定微球之间建立有效连接后，光镊操控 B 球靠近 A 球，达到开始拉伸的位置，然后拖拽 B 球向着远离 A 球的方向拉伸。当拉伸外力或者拉伸长度达到阈值时，B 球转向慢慢靠近 A 球，转为分子回复过程。当 B 球回复到拉伸起始位置后，系统停止回复，开始进行下一次拉伸动作，如此往复拉伸与回复，直到人为停止。

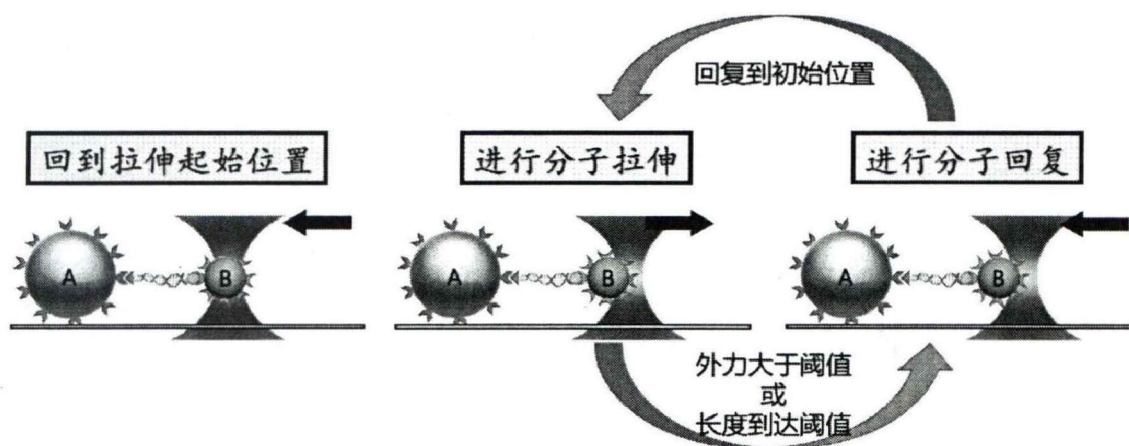


图 3-3 拉伸/回复分子流程示意图

**数据记录：**数据主要有两部分：一是连接试探时，B 球靠近 A 球过程中，记录 PSD 的信号变化，采集数据如图 3-4 所示。可以看出当 B 球靠近甚至接触 A 球时，PSD 输出的位置信号有剧烈变化，即 A 球对 PSD 信号产生影响。只有将背景曲线扣除后，才能得到可信的拉伸数据曲线。二是实时记录拉伸/回复曲线，我们使用 100 kHz 的采集速度，每进行一次拉伸/回复存储一次数据，处理这些数据得到“力-伸展”曲线。

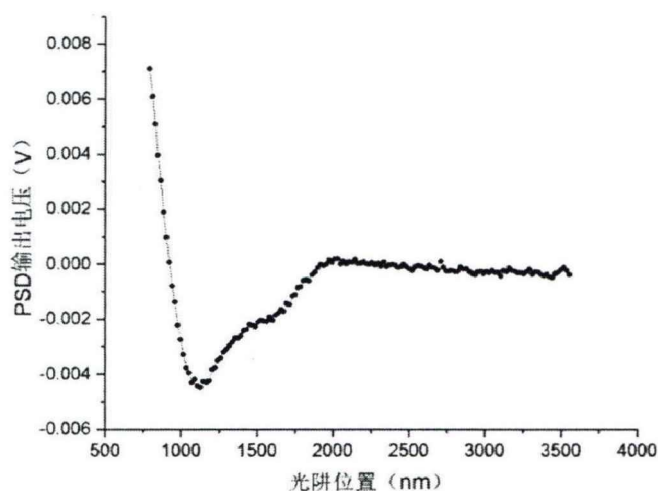


图 3-4 光阱位置-PSD 输出电压曲线图。

图中横坐标单位为纳米，代表光阱的相对位置，纵坐标为 PSD 输出的电压值。

**条件锁定平台漂移：**我们使用图像识别的方法计算出系统的漂移，并通过压电平台进行反馈来得到高精度的 *rpoS* RNA 拉伸/回复曲线，具体的反馈方法见 2.1.3 节。然而不停的反馈可能会对采集的拉伸/回复曲线引入额外噪声，考虑到一次拉伸/回复过程只需要几秒到几十秒，在这个时间内系统漂移可以忽略

不计, 因此我们决定采取“条件锁定”平台漂移方式: 即在每次拉伸/回复结束之后进行一次反馈, 修正系统的漂移, 而非实时。条件反馈实现的 Labview 程序框图如图 3-5 所示。

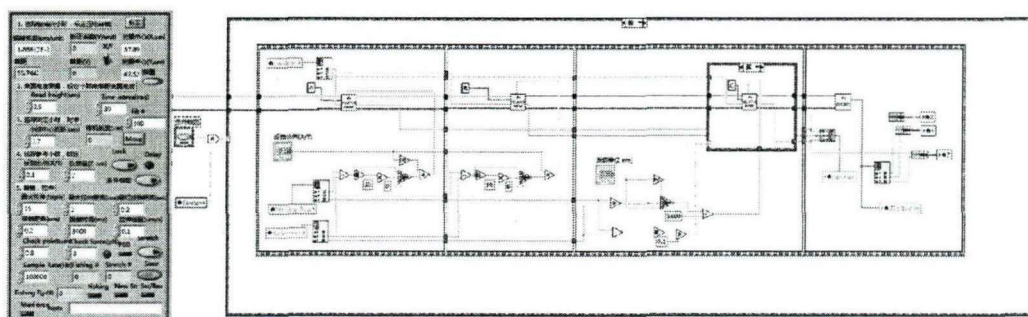


图 3-5 分子拉伸模块 Labview 前面板与条件锁定平台漂移 Labview 程序框图。

## 3.2 *rpoS* RNA 样品制备

用光镊研究 *rpoS* RNA 自抑制茎环结构, 首先需要将 *rpoS* RNA 制备成适合于光镊使用的样品。这一段自抑制茎环结构只有 87 个核苷酸, 轮廓长度 (Contour Length, CL) 约 51 nm。采用哑铃模式进行单分子实验时, RNA 直接连接在两个微球之间, 会使微球间距过小, 影响光场导致 PSD 测量数据错误, 因此需要加长分子长度。我们利用互补配对的单链 DNA 将全长 1226 个核苷酸的单链 *rpoS* RNA 5' UTR 上非研究区域覆盖, 相当于在自抑制茎环结构两端各连接了一段 DNA-RNA 杂交手柄。手柄两端分别修饰了生物素和地高辛, 使用带有链霉菌亲和素 (streptavidin) 的微球和带有地高辛抗体的微球便可以将研究的分子固定在两个微球之间。

### 3.2.1 模板 DNA 制备方法与流程

首先将全长的 *rpoS* RNA 序列插入到 pet22b 载体的 HindII 和 XhoI 酶切位点之间, 然后转入大肠杆菌进行扩增, 作为第一步 PCR 的模板, 对应于图 3-6 中的 A。PCR 模板前向引物 (template forward primer):

GAAATTAATACGACTCACTATACAGTTCAACACGCTTGCATTTTGAATTC  
GTTACAAGGGG.

起点位于 *rpoS* 序列前 40 bp (base pair, bp) 处, 并在引物 5' 端增加了一段 T7 启动子序列 (划线部分)。模板后向引物 (template reverse primer):

TTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAACTCAGCTTCCTTTCGGGC.

位于 5' UTR 序列末尾。使用模板前向引物与模板后向引物从包含有 *rpoS*

序列的质粒上经过 PCR 扩增得到在前端包含有 T7 启动子序列的 1246 bp 双链 DNA 模板 (图 3-6 B)。

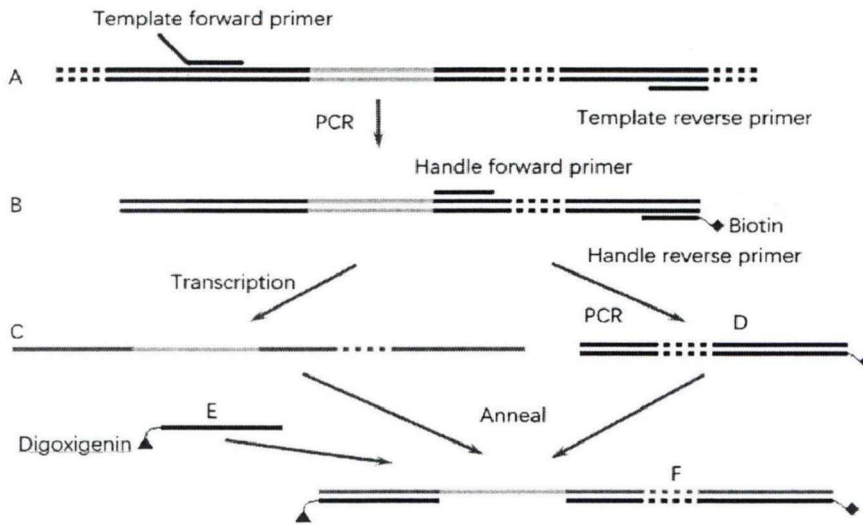


图 3-6 RNA 样品制作流程。

图中黑色线条表示 DNA, 灰色线条表示 RNA, 红色为 T7 启动子序列, 淡蓝色为 *rpoS* RNA 自抑制茎环序列, 箭头指示反应方向。A 为包含 *rpoS* 序列的质粒; B 为从质粒扩增得到的模板 DNA; C 为从模板逆转录得到的全长 *rpoS* RNA; D 为右侧手柄; E 为左侧手柄; F 为通过退火得到的待拉伸分子。

### 3.2.2 转录 *rpoS* RNA 流程

使用标准 RNA 转录试剂盒 (Ambion, MEGAscript T7, AM1334), 按照试剂盒的转录程序进行转录。通过 DNA 模板 (图 3-6 B) 转录出全长的 *rpoS* RNA 5' UTR (图 3-6 C), 具体流程如下:

- 1) 在 DNA 模板中加入 ATPs、CTPs、GTPs、UTPs 和 T7 RNA 聚合酶, 37°C 的条件下转录 3 小时得到 *rpoS* RNA 5' UTR 序列;
- 2) 加入 1  $\mu$ l DNase, 在 37°C 下反应 15 分钟, 分解溶液中的 DNA 模板;
- 3) 加入 30  $\mu$ l LiCl 和 1 ml 70%乙醇, 在 -20°C 下冷冻 30 分钟以上;
- 4) 14000 rpm 高速离心 15 分钟, 除去上清溶液得到纯度较高的 *rpoS* RNA 5' UTR;
- 5) 加入 50  $\mu$ l DEPC 水获得全长的 *rpoS* RNA 5' UTR, 光谱测量 RNA 浓度为 283.57 ng/ $\mu$ l。

转录得到产物为中间包含有 87 nt 自抑制茎环结构的 1224 nt 单链 *rpoS* RNA 5' UTR。凝胶电泳结果如图 3-7 所示, 跑胶结果显示产物为单一条带且产物长度与预期吻合。



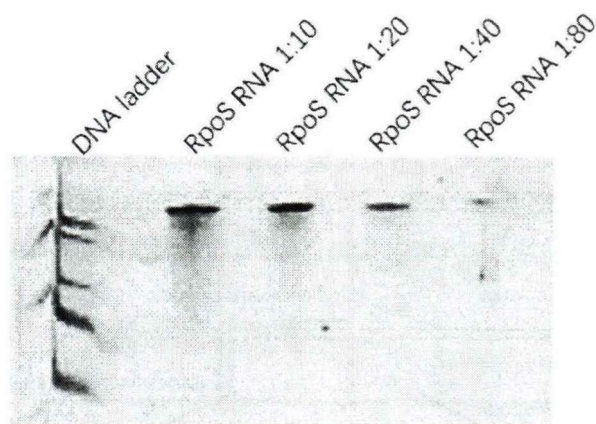


图 3-7 N+1 *rpoS* RNA 凝胶电泳图。

从左向右分别是 DNA Ladder、10 倍稀释 *rpoS* RNA、20 倍稀释 *rpoS* RNA、40 倍稀释 *rpoS* RNA 和 80 倍稀释 *rpoS* RNA。

### 3.2.3 DNA 手柄制备

转录得到的 RNA 中保留有待研究的 87 nt 自抑制茎环结构，其余部分则在退火过程中与互补的单链 DNA 配对形成双螺旋结构作为拉伸的手柄。因此我们将带有 T7 启动子序列的 DNA (图 3-6 B) 作为模板，使用手柄前向引物 (handle forward primer) 与手柄后向引物通过 PCR 扩增出右侧手柄 (图 3-6 D)。其中手柄后向引物 5' 端预先用生物素标记，引物序列为：

Handle forward primer:

AGGAGCCACCUUAUGAGUCAGAAUACGCUGAAAGUUCAUG。

Handle reverse primer:

biotin-TTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAACCTCAGCTTCCTTTCGGGC。

### 3.2.4 RNA/DNA 手柄退火

最后将人工合成 3' 端带有地高辛标记的 oligo (dig-oligo, 图 3-6 E)、全长 *rpoS* RNA (图 3-6 C) 和右侧手柄 (图 3-6 D) 按照摩尔比 1: 1: 2 的比例在退火缓冲液中混合，放于 PCR 仪中。控制温度变化为：85°C 10 分钟，62°C 1.5 小时，52°C 1.5 小时，然后在 10 分钟内逐渐降低到 10°C 进行退火。得到的混合物用乙醇沉淀法进行提纯 (同转录 RNA 提纯方式)。最后得到 RNA 样品 (图 3-6 F) 分子两端为 DNA-RNA 杂交双螺旋，分子末端分别标记了一个生物素和地高辛分子，中间没有配对的部分为被研究的 *rpoS* RNA 自抑制茎环。

Dig-oligo 序列:

CCCCTTGTAACGAATTTCAAAATGCAAGCGTGTGAACTG-dig。

### 3.2.5 样品室内样品制作

首先按照 2.3 节中流程对盖玻片进行清洗与修饰,在样品室底面修饰上大量的醛基。随后向样品室中加入直径为 2.11  $\mu\text{m}$  地高辛抗体修饰的微球 (Spherotech, DIGP-20-2, 2.11 $\mu\text{m}$ ), 缓冲液为 PBS (Thermo, SH30256.0113)。样品室底面朝下孵育 30 分钟,使微球粘连在样品室底面。孵育过的样品室用 400  $\mu\text{l}$  TKE 缓冲液冲洗两次,室温孵育 30 分钟封闭裸露化学键。TKE 缓冲液成分为 200 mM KCl、100 mM Tris-HCl、1 mM EDTA 和 1 ng/ $\mu\text{L}$   $\alpha$ -casein(Sigma, C6780  $\alpha$ -Casein from bovine milk), pH 值为 7.5, 根据实验条件选择是否加入 10 mM  $\text{MgCl}_2$ 。

链霉亲和素修饰的直径为 1.07  $\mu\text{m}$  微球 (Spherotech, SVP-10-5, 1.07  $\mu\text{m}$ ) 依次用 PBS 和 TKE 缓冲液洗涤后稀释 50 倍,与 1  $\mu\text{L}$  200 倍稀释的带拉伸分子溶液混合,4 $^{\circ}\text{C}$  下翻滚孵育 120 分钟。孵育后的小球溶液注入 TKE 冲洗过的样品室中,移至光镊系统上进行实验。

### 3.3 *rpoS* RNA 的力谱特性

光镊对 *rpoS* RNA 自抑制茎环进行拉伸得到该分子的“力-伸展”曲线,通过对曲线的进一步分析,能从中提取出自抑制茎环结构的信息。本节着重介绍对于采集数据的分析方法与得到的结论。

在光镊拉伸整个待研究分子时, B 球以 1.89 pm 的步长, 20 nm/s 的速度远离 A 球。光镊平均刚度为 377 pN/ $\mu\text{m}$ , 最大张力达到预设值 30 pN 时停止拉伸。整个拉伸过程被 PSD 以 100 kHz 高速采集,采集的数据通过数字平均至 100 Hz 后存储在电脑中供分析使用。随着拉伸的进行,加载在分子两端的力越来越大,最终将 *rpoS* RNA 自抑制茎环内部结构打开。当自抑制茎环结构打开时, B 球跃向光阱中心,分子上的受力骤然减小,在拉伸曲线上形成锯齿结构;相反当光镊操纵 B 球接近 A 球过程中,自抑制茎环会重新折叠,使 B 球远离光阱中心,分子两端的受力增加,在回复曲线上形成与拉伸过程类似的锯齿。“力-伸展”曲线如图 3-8 所示,可以明显看到由于自抑制茎环结构打开引起的锯齿结构。

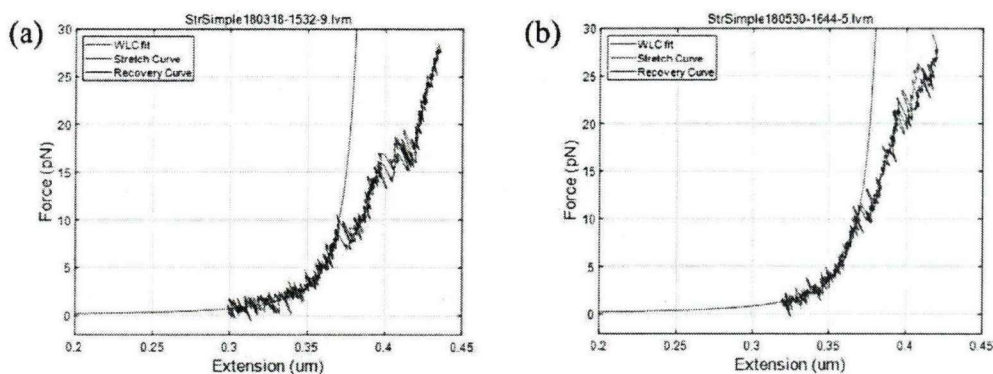


图 3-8 *rpoS* RNA 自抑制茎环“力-伸展”曲线。

图 (a) 为 RNA 在 TKE 缓冲液中的“力-伸展”曲线。棕色为拉伸曲线，蓝色为回复曲线，淡蓝色的光滑曲线为蠕虫链拟合曲线。图中横坐标为拉伸长度，单位纳米，纵坐标为分子上施加外力，单位皮牛。图 (b) 为含有 10 mM  $MgCl_2$  TKE 缓冲液中的“力-伸展”曲线。

### 3.3.1 拉伸曲线打开长度计算

通过图 3-8 中“力-伸展”曲线可以明显看出自抑制茎环是分多次打开的，这说明自抑制茎环不同于简单“发卡结构”的结构，为了研究清楚自抑制茎环结构，我们对“力-伸展”曲线进行精细分析。自抑制茎环内部结构被打开时两端距离突然伸长，所受张力明显下降，拉伸曲线在图 3-9 中 A 点形成一个向下的转折。此时自抑制茎环两端的 DNA-RNA 杂交手柄会随之收缩，因此跃变前后长度变化比实际自抑制茎环打开的长度要小（图 3-9 中 B 点）。当光镊继续拉伸至跃变时外力大小（图 3-9 中 C 点），此时手柄的长度与跃变时手柄长度相同，用此时的分子长度减去跃变时的分子长度才是自抑制茎环结构被打开的长度变化量，如图 3-9 中的 1st open length。如果在外力上升到跃变初始时的水平之前发生了第二次跃变，将两次跃变中间曲线线性拟合后适当延长，推定出参考点位置，如图 3-9 中 C 点，然后计算打开的长度。考虑到延长的距离一般较短，线性拟合可以作为在未知打开长度时局部蠕虫链模型的近似。

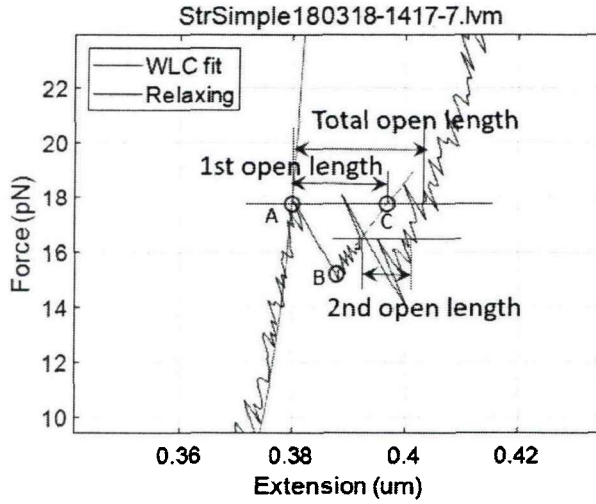


图 3-9 RNA 打开长度测量方法示意图。

蓝色为实验数据，绿色为蠕虫链（WLC）模型拟合结果。红色为自抑制茎环打开长度。A、B、C 为测量标识点，红色圆圈为 RNA 结构改变的特征位置。

通过上面描述的方法，我们对采集到的“力-伸展”曲线进行了统计，主要包括结构打开时对应外力大小与打开长度，并通过分析得到多种的打开途径（将在 3.3.2 节中详细介绍）。统计结果如表 3-1、表 3-2 所示，表中的理论打开长度计算方法详见 3.3.4 小节。

表 3-1: 光镊力三次打开自抑制茎环途径分类（不含 MgCl<sub>2</sub>）

打开途径	第一次		第二次		第三次	
	力 (pN)	长度 (nm) 实验/理论	力 (pN)	长度 (nm) 实验/理论	力 (pN)	长度 (nm) 实验/理论
a→c→d→h	7.01±1.80	12.24±0.99	12.62±1.63	9.36±0.91	16.36±1.23	12.74±1.34
		13.52		8.13		11.18
a→c→f→h	8.63±1.38	12.54±1.48	15.83±1.48	11.88±1.15	16.71±1.26	8.92±0.85
		13.52		11.92		7.39
b→c→d→h	7.14±1.10	6.64±0.37	11.74±0.49	8.86±1.61	15.31±1.76	12.55±1.61
		6.82		8.13		11.18
b→c→e→g	5.03	8.11	5.93	8.12	13.77	8.49
		6.82		7.22		8.13

表 3-2: 光镊力三次打开自抑制茎环途径分类（含有 10 mM MgCl<sub>2</sub>）

打开途径	第一次		第二次		第三次	
	力 (pN)	长度 (nm) 实验/理论	力 (pN)	长度 (nm) 实验/理论	力 (pN)	长度 (nm) 实验/理论
a→c→e→h	11.68±1.02	14.02±0.52	17.04±0.55	8.30±1.30	18.89±1.65	12.92±0.52
		14.74		7.63		12.60

a→c→f→h	11.75±1.66	11.33±1.78	20.45±2.36	11.34±1.00	24.15±2.28	7.56±0.68
		14.74		12.54		7.88
a→c→d→h	12.34±0.90	10.94±2.10	20.44±1.62	9.10±1.70	23.95±3.89	11.56±0.93
		14.74		8.49		11.93
b→c→f→h	10.42±1.07	7.66±0.82	21.05±2.33	11.16±0.70	24.72±0.63	7.29±0.70
		7.30		12.54		7.88
b→c→e→g	10.64±0.21	8.36±0.56	22.69±0.55	8.61±0.43	25.01±0.84	9.10±0.56
		7.30		7.63		8.49
a→c→e→g	11.04±1.38	10.33±1.33	20.56±4.23	9.10±0.77	24.95±0.40	7.75±0.00
		14.74		7.63		8.49

### 3.3.2 rpoS RNA 自抑制茎环的打开路径

根据上一节对于“力-伸展”曲线中打开自抑制茎环结构外力与打开长度的统计与分析，结合上 MFold 软件对于自抑制茎环二级结构的预测，我们列举出自抑制茎环在外力作用下打开可能经历的中间状态，如图 3-10 所示。每打开一个核苷酸，单链 RNA 轮廓长度增加约 0.59 nm<sup>[47-49]</sup>。在溶液环境中的 RNA 双螺旋主要以 A-form 存在，双螺旋直径约 2 nm。在计算自抑制茎环结构被打开放出单链核苷酸使分子链延长的同时，还要计算暴露或消除一个双螺旋末端对应的长度变化，如图 3-10 中 b→c, d→f 等过程。根据 MFold 软件预测的自抑制茎环二级结构，在自抑制茎环中存在 I, II, III 三个 bubble 结构，每个 bubble 是自抑制茎环在打开过程中最有可能停留的中间状态。

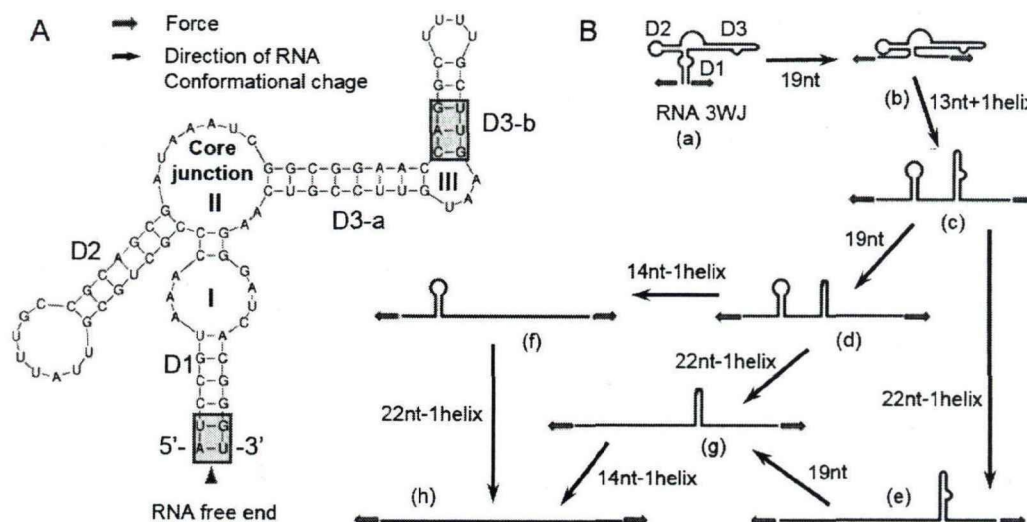


图 3-10 *RpoS* RNA 自抑制茎环二级结构及其在外力作用下打开路径示意图。

图中，D1、D2 和 D3 代表自抑制茎环的三个茎环。I、II、III 代表自抑制茎环中的三个 bubble；其中 II 为茎环核心区；红色方框内为结合强度较弱的区域。红色箭头

表示外力拉伸方向；黑色箭头指示自抑制茎环打开的路径。字母 (a) - (h) 为 RNA 在打开过程中可能停留的中间状态。nt 代表自抑制茎环沿箭头方向发生状态变化过程中被打开的核苷酸数量，helix 代表变化过程中暴露出来或者被消除的双螺旋末端数目。

从软件预测的二级结构分析，*rpoS* RNA 自抑制茎环可以分成五个相对独立的单元。其中包括 D1、D2、D3-a 和 D3-b 四个双螺旋结构，以及自抑制茎环中心的核心结构。我们计算出这五个单元被打开时预期长度的变化并与实验测得的分子长度增量进行对比，用来识别自抑制茎环在外力作用下的打开路径。通过统计发现实验中测得的打开长度与理论计算基本吻合，如表 3-3 中所示的四次打开过程，这也说明了光镊拉伸实验具有很高的测量精度和稳定性。

表 3-3: 自抑制茎环四次打开的测量与理论数据 (含有 10 mM MgCl<sub>2</sub>)

第一次打开 (pN, nm)		第二次打开 (pN, nm)		第三次打开 (pN, nm)		第四次打开 (pN, nm)	
力	打开长度 实验/理论	力	打开长度 实验/理论	力	打开长度 实验/理论	力	打开长度 实验/理论
9.162	7.38/7.45	10.96	7.01/7.30	17.55	8.12/8.49	18.08	11.07/11.93

实验得到的大部分自抑制茎环打开曲线包含有三个锯齿结构，分别测量出每次自抑制茎环结构变化所产生的长度改变并与图 3-10 预测的长度变化进行对比，辨认出所有伸展曲线对应的打开路径，进行分类后结果如下。

在大部分无镁离子拉伸实验中，*rpoS* RNA 自抑制茎环的打开途径有两种，一是 D1+核心区 II→D3→D2 (图 3-10 中 a→c→f→h)，二是 D1+核心区 II→D3-a→D3-b+D2 (图 3-10 中 a→c→d→h)。

其中也有个别 c→d 的打开长度与理论计算结果相比偏大 (9.36nm vs. 8.13nm)，我们推测这是因为 D3-b 双螺旋起始段结合力相对较弱 (图 3-10 中 D3-b 中红色方框部分)，在拉伸过程中有一定几率随 D3-a 一起被打开。

还有两种方式比例较小，是直接从核心区域开始打开的途径，分别对应于 b→c→d→h 和 b→c→e→g 过程。此时自抑制茎环的 D1 茎环处于自然打开状态，光镊力直接作用到自抑制茎环的核心部分。考虑到 D1 茎环本身结合强度较弱 (小于 10 pN)，这种现象是很有可能出现的。同时这一现象在自抑制茎环 AFM 三维形貌图中也有佐证，说明这可能是 *rpoS* RNA 自抑制茎环的一种存在方式。

在含有镁离子的拉伸实验中，*rpoS* RNA 自抑制茎环主要存在三种打开路径，分别为：D1+核心区 II→D3→D2 (图 3-10 中 a→c→f→h)；D1+核心区 II→D2→D3 (图 3-10 中 a→c→e→h) 以及 D1+核心区 II→D3-a→D2+D3-b (图 3-10 中 a→c→d→h)。

与没有镁离子的情况相同，绝大多数拉伸曲线第一次打开都是同时打开了

D1 和 three-way-junction 的核心部分<sup>[125]</sup>；不同的是，自抑制茎环的打开途径增加了 a→c→e→h 这一种，由此推测镁离子改变了 D2 和 D3 茎环间的相对强度，从而使 D2 有一定概率先于 D3 打开。

综上，镁离子的存在增强了自抑制茎环内相互作用，使得打开结构所需外力增加。这导致部分自抑制茎环结构在最大拉力（30 pN）下仍然没能被全部打开，同时第一次打开所需外力也从不含镁离子的 7.5 pN 增大为 11 pN。此外，含有镁离子的“力-伸展”曲线更加复杂，尤其体现在 a→c 的过程中，实验测得的打开长度明显小于通过二级结构计算出来的长度。我们认为造成这一现象的原因是 D1 茎环中存在比较薄弱区域（图 3-10 中红色方框内），这个区域在第一个锯齿结构出现前就已经打开了。

我们的分析方法可以精确地得到每一条拉伸/回复曲线对应的打开路径，为计算自抑制茎环局部结构自由能奠定了基础。

### 3.3.3 蠕虫链模型

人们研究聚合物物理性质时，提出了用蠕虫链（Worm-like Chain, WLC）模型描述半柔性聚合物行为<sup>[126]</sup>。该模型将柔性聚合物看成多个片段，每个片段是刚性的并指向同样的方向；但驻留长度（Persistence Length, PL）一般远小于分子链长度，这代表整个分子链表现出较强的柔性。WLC 模型是 Kratky Porod 模型的连续化版本。

WLC 模型假想了一个连续柔性连接的各向同性的杆，不同于自由连接链模型中离散的自由铰链，该模型适用于描述较硬的聚合物。在室温下，聚合物呈平滑的弯曲构象，连续的片段表现出协同性，即相邻片段方向大致对齐。在 T=0 K 时，聚合物呈刚性棒状构象。

假设一个分子链总长度为  $L_0$ ，分子链的路径为  $s \in (0, L_0)$ 。令  $\vec{t}(s)$  为分子链的单位切向量， $\vec{r}(s)$  为分子链的位置向量，于是有  $\vec{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}(s)}{\partial s}$ ，链的端到端距离为  $\vec{R} = \int_0^{L_0} \vec{t}(s) ds$ ，链弯曲相关的能量为：

$$E = \frac{1}{2} k_B T \int_0^{L_0} P \cdot \left( \frac{\partial^2 \vec{r}(s)}{\partial s^2} \right)^2 ds, \quad (3.1)$$

其中  $P$  为分子链的驻留长度， $k_B$  为玻尔兹曼常数， $T$  为绝对温度。在有限的温度下，温度的涨落会导致分子链产生一个随机的弯曲，所以分子链的端到

端长度是明显小于链总长度  $L_0$  的。于是可进一步计算分子链的方向相关函数，该函数随着衰变常数  $1/P$  成指数形式衰减：

$$\langle \vec{t}(s) \cdot \vec{t}(0) \rangle = \langle \cos \theta(s) \rangle = e^{-s/P}, \quad (3.2)$$

还可以得到一个非常有用的参数，即均方端到端距离：

$$\begin{aligned} \langle R^2 \rangle &= \langle \vec{R} \cdot \vec{R} \rangle = \left\langle \int_0^{L_0} \vec{t}(s) ds \cdot \int_0^{L_0} \vec{t}(s') ds' \right\rangle \\ &= \int_0^{L_0} ds \int_0^{L_0} ds' \langle \vec{t}(s) \cdot \vec{t}(s') \rangle = \int_0^{L_0} ds \int_0^{L_0} ds' e^{-|s-s'|/P}, \end{aligned} \quad (3.3)$$

$$\langle R^2 \rangle = 2PL_0 \left[ 1 - \frac{P}{L_0} (1 - e^{-L_0/P}) \right], \quad (3.4)$$

从公式(3.4)可以看出，当  $L_0 \gg P$  时，得到  $\langle R^2 \rangle = 2PL_0$ ，表明在 WLC 模型中 Kuhn 距离的长度是驻留长度两倍；当  $L_0 \ll P$  时，得到  $\langle R^2 \rangle = L_0^2$ ，分子链表现如同刚性杆。图 3-11 中曲线表示随着分子驻留长度的增大，分子链从柔性向刚性转化的过程。

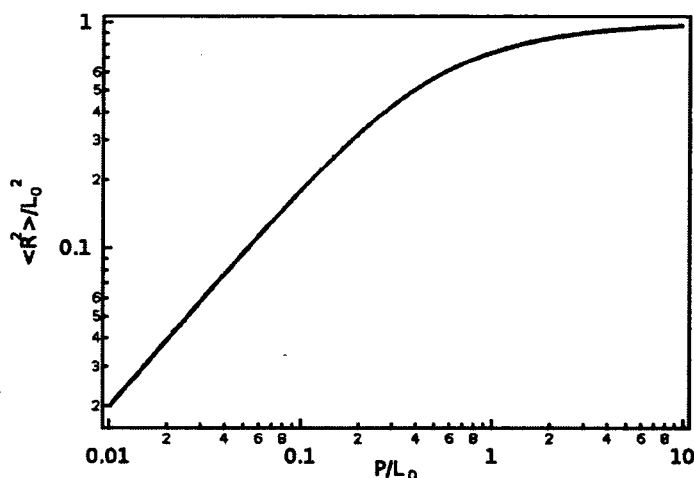


图 3-11 分子链的柔性向刚性过度曲线。

图中横坐标为驻留长度除以分子链总长度，纵坐标为均方端到端距离除以分子链总长度的平方。

进一步需要研究分子链在外力作用下的行为。在外力下，分子链被拉直，热涨落变小，分子链的熵也随之减小，所以我们可以通过分子链总能量的方式进行研究：



$$H = H_{elastic} + H_{external} = \frac{1}{2} k_B T \int_0^{L_0} P \cdot \left( \frac{\partial^2 \vec{r}(s)}{\partial s^2} \right)^2 ds - xF, \quad (3.5)$$

这里分子链的轮廓长度为  $L_0$ , 驻留长度为  $P$ , 分子链的伸长为  $x$ , 外力为  $F$ 。

根据这个特性可以得到一个近似的“力-伸展”差值公式:

$$\frac{FP}{k_B T} = \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{x}{L_0} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0}, \quad (3.6)$$

该公式是简单的低阶近似形式, 虽然存在约 15% 的相对误差, 但使用起来比较方便。因此我们使用它进行 RNA 分子力谱拟合, 该公式也就是被人熟知的 Marko-Siggia WLC 模型“力-伸展”公式。

然而该模型在写能量公式时忽略了焓的贡献, 因此只适用于约 0.1~5 pN 的外力范围。为了满足 5 pN 以上外力情况的使用, 然后人们提出了 WLC 的修正模型, 即 Modified Marko-Siggia WLC 模型。该模型考虑焓的贡献, 并引入分子链弹性模量  $K_0$ , 使 WLC 模型外力适用范围扩展至约 0.1~50 pN 的区间。Modified Marko-Siggia WLC 模型的“力-伸展”公式如下:

$$\frac{FP}{k_B T} = \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{x}{L_0} + \frac{F}{K_0} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} - \frac{F}{K_0}, \quad (3.7)$$

### 3.3.4 rpoS RNA 的蠕虫链模型拟合

我们使用的分子链符合 WLC 模型所描述的半柔性分子链模型, 然而实验中的分子链更为复杂。首先分子链中间 87 个核苷酸的自抑制茎环结构在没有外力的情况下会自行折叠, 在外力足够大时去折叠成为一段约 51 nm 长的单链 RNA (ssRNA)。其次分子两端都是 DNA-RNA 杂交手柄, 为双链结构。双链分子链与单链分子链均有自己的驻留长度与分子弹性模量, 并且单链与双链的参数相差较大, 所以需要将双链手柄和单链 RNA 分开计算。

中间的 RNA 单链长度非常短, 它的弹性对整个链伸长贡献不大, 且拟合参数过多不利于拟合稳定性, 因此我们使用 Marko-Siggia WLC 模型来描述这一段。根据 Bustamante 等人的工作, RNA 单链一个核苷酸的长度约为 0.59 nm, 87 个核苷酸的分子链长度约为 51.33 nm, 即轮廓长度, 驻留长度需要拟合得到。

在拟合得到驻留长度后, 通过公式(3.6)能计算出在外力  $F$  下的 RNA 分子链长度  $x$ , 进一步得到在该外力下每个核苷酸的平均长度。例如在不含有镁离子情况下 a→c 的打开过程中, 平均外力在 7.5 pN 左右, 从而得到每个核苷酸长

度约为 0.36 nm，同时 a→c 过程中增加了一个双螺旋末端，因此打开的总长度为 0.36 nm\*32+2 nm=13.52 nm。表 3-1、3-2、3-3 中的理论打开长度可如此计算得到。

将两段 DNA-RNA 杂交手柄合并处理，两段手柄的总长度约为 296 nm，是分子链中较长的部分，使用 Modified Marko-Siggia WLC 模型进行拟合。在这个模型下，需要拟合的参数有驻留长度和分子弹性模量。整个分子链在外力作用下伸长的长度等于单链 RNA 与 DNA-RNA 杂交手柄伸长之和：

$$x_{total}(F) = x_{ssRNA}(F) + x_{handle}(F) \quad (3.8)$$

为了得到公式中的诸多参数，需要选出数据曲线中 DNA-RNA 杂交手柄拉伸的曲线，如图 3-12 (a) 中的绿色数据点所示，对其进行 Modified Marko-Siggia WLC 模型拟合，得到曲线的驻留长度、弹性模量和拉伸距离偏移量  $\Delta x$ 。引入拉伸距离偏移量是因为实际拉伸并不是从分子长度为 0 的点开始，同时也不知道开始拉伸时分子的长度，所以拉伸的绝对起始位置需要通过拟合得到。拟合后的曲线如图 3-12 (a) 中的蓝色曲线所示。进一步需要知道 87 nt 自抑制茎环结构完全打开后单链 RNA 的驻留长度，为此使用自抑制茎环结构完全打开后的数据点减去对应外力下手柄拟合曲线的数据点，得到单链 RNA 在外力拉伸下的“力-伸展”曲线，如图 3-12 (b) 中数据所示，其中红色曲线为单链 RNA 拉伸拟合曲线。通过拟合得到单链 RNA 的驻留长度后，便可以写出完整的公式(3.8)，从而得到图 3-12 (a) 中的红色拟合曲线，可见拟合效果良好。

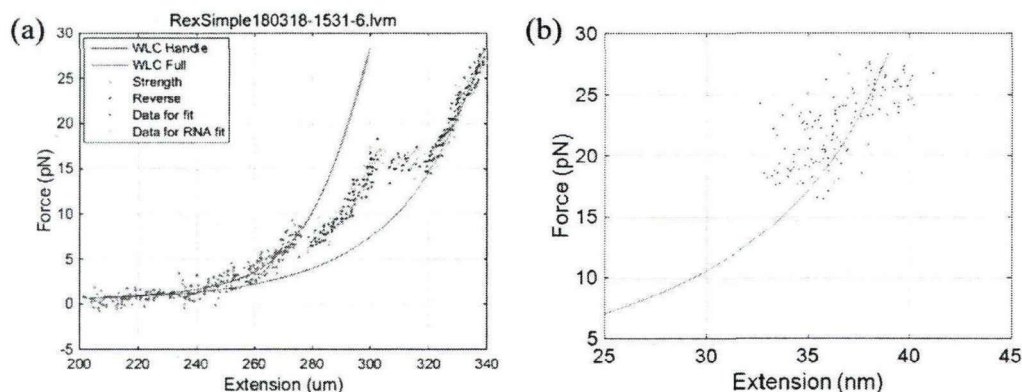


图 3-12 整个分子“力-伸展”曲线及拟合曲线与单链 RNA 拉伸曲线及拟合曲线。

图(a)中横坐标为拉伸距离，纵坐标为分子上的外力，其中绿色点为拉伸/回复手柄的数据点，黄色为拉伸整个分子的数据点，紫色为回复整个分子的数据点，蓝色曲线为拉伸/回复手柄的拟合曲线，红色曲线为自抑制茎环结构完全打开后整个分子的拉伸拟合曲线。图(b)为仅中间 87 个核苷酸单链 RNA 的拉伸曲线。

### 3.4 rpoS RNA 自抑制茎环折叠自由能

通过对自抑制茎环打开路径的统计与分析，加上蠕虫链模型对“力-伸展”曲线的拟合，进一步可以计算自抑制茎环折叠自由能的大小，有助于更加直观地了解这段结构，方便将自抑制茎环结构与其他已知结构进行比对，让我们对其有更深刻的认识。

#### 3.4.1 MFold 预测自抑制茎环折叠自由能

我们用 MFold 软件预测了自抑制茎环 87 核苷酸序列折叠的自由能，表 3-4 详细展示了软件对每个核酸对、双螺旋结构与成环结构自由能的预测，MFold 预测打开整个自抑制茎环结构需要 158.6 kJ/mol 的能量。MFold 对于自由能的预测存在局限性，首先是无法预测存在二价离子（本实验是镁离子）情况下的折叠自由能，这意味着无法研究二价离子对于折叠的影响，然而二价离子对于 DNA 的分子骨架、RNA 的空间结构都有较大影响。其次是 MFold 软件对于一些复杂的成环结构难以给出准确的能量预测，比如 three-way-junction 的核心结构。综上，MFold 软件对于自由能的预测可以作为参考，但并非严格真实的折叠自由能大小。

表 3-4: MFold 软件对于自抑制茎环结构折叠自由能预测

结构元素	自由能(kcal/mol)	信息
Stack	-1.12	External closing pair is A <sub>1</sub> -U <sub>87</sub>
Stack	-1.55	External closing pair is U <sub>2</sub> -G <sub>86</sub>
Stack	-3.26	External closing pair is C <sub>3</sub> -G <sub>85</sub>
Stack	-2.23	External closing pair is C <sub>4</sub> -G <sub>84</sub>
Stack	-2.41	External closing pair is G <sub>5</sub> -C <sub>83</sub>
<b>Helix</b>	-10.57	6 base pairs.
Interior loop	1.88	External closing pair is U <sub>6</sub> -A <sub>82</sub>
Stack	-3.26	External closing pair is C <sub>10</sub> -G <sub>77</sub>
<b>Helix</b>	-3.26	2 base pairs.
Multi-loop	4.31	External closing pair is C <sub>11</sub> -G <sub>76</sub> 9 ss bases & 3 closing helices.
Stack	-1.55	External closing pair is G <sub>41</sub> -C <sub>73</sub>
Stack	-2.39	External closing pair is G <sub>42</sub> -U <sub>72</sub>
Stack	-2.23	External closing pair is C <sub>43</sub> -G <sub>71</sub>
Stack	-3.26	External closing pair is G <sub>44</sub> -C <sub>70</sub>
Stack	-2.73	External closing pair is G <sub>45</sub> -C <sub>69</sub>
Stack	-1.12	External closing pair is A <sub>46</sub> -U <sub>68</sub>

Stack	-2.41	External closing pair is A47-U67
Helix	-15.69	8 base pairs.
Bulge loop	3.36	External closing pair is C48-G66
Stack	-2.14	External closing pair is C49-G62
Stack	-0.62	External closing pair is A50-U61
Stack	-2.32	External closing pair is G51-U60
Stack	-3.82	External closing pair is G52-C59
Helix	-8.90	5 base pairs.
Hairpin loop	3.22	Closing pair is C53-G58
Stack	-2.23	External closing pair is C12-G33
Stack	-3.82	External closing pair is G13-C32
Stack	-1.93	External closing pair is C14-G31
Stack	-2.14	External closing pair is U15-A30
Stack	-3.82	External closing pair is G16-C29
Stack	-2.23	External closing pair is C17-G28
Helix	-16.17	7 base pairs.
Hairpin loop	3.94	Closing pair is G18-C27

### 3.4.2 “力-伸展”曲线计算自抑制茎环折叠自由能

为了计算 *rpoS* RNA 自抑制茎环打开所需要的自由能，先需要计算在拉伸过程中外力做功和回复过程中外力做的负功。在拉伸过程中，当外力达到一定值后，会打开自抑制茎环中的结构。外力做的功主要包含两部分，一是打开自抑制茎环结构所做的功，为自抑制茎环折叠自由能；二是拉伸整个分子链所做的功。整个分子拥有一定弹性，外力拉伸会使其伸长，外力做功会转化为弹性势能存储在其中。其中主要包含有拉伸 DNA-RNA 杂交手柄做功  $W_{handle}$  和拉伸单链 RNA 做功  $W_{ssRNA}$ ，由此得到在准静态拉伸过程与忽略耗散的情况下，自抑制茎环结构自由能  $G_s = W_s - W_{handle} - W_{ssRNA}$ ，其中  $W_s$  为拉伸过程中外力做的总功。同理分析回复过程可以得到  $G_r = W_{handle} + W_{ssRNA} - W_r$ ，其中  $W_r$  为回复过程中外力所做负功。因为外力方向与分子链末端运动方向相反，所以  $W_{handle}$ 、 $W_{ssRNA}$  和  $W_r$  三者均为负值。

外力做功计算通过对“力-伸展”曲线进行数字积分得到。为了使计算的做功尽量准确，我们对每一个实验所用微球进行了功率谱标定，计算出光镊的刚度，减小微球大小不均一对实验的影响。进一步考虑到一次拉伸与回复过程中，拉伸过程的终止点应该与回复过程的终止点是同一个点，利用公式(3.8)计算出

在拉伸外力最大处对应的拟合曲线数据点作为拉伸终止点与回复起始点，这样可以减少起始点在实验中受到受限布朗运动引起的位置涨落影响。通过对整条采集到的拉伸曲线进行数字积分便可以得到在整个过程中外力所做的功。 $W_{handle}$  与  $W_{ssRNA}$  的计算通过对 DNA-RNA 杂交手柄拟合曲线与单链 RNA 拟合曲线进行数字积分实现，具体的拟合方法见 3.3.4 节。

通过采集到的“力-伸展”曲线，计算拉伸过程外力做功与回复过程外力做的负功。如果将拉伸与回复过程都视为准静态过程，二者应都等于自抑制茎环折叠的自由能。然而实际上拉伸/回复中会存在耗散与涨落，拉伸打开自抑制茎环结构所做的功略大于自抑制茎环折叠的自由能，而回复过程外力所做的负功小于自抑制茎环折叠的自由能。根据 Gavin Crooks 发展的理论<sup>[127, 128]</sup>，即使拉伸/回复过程与平衡态相距甚远，外力做功与生物分子自由能变化之间仍然存在如下的关系：

$$e^{-\beta\Delta G} = \frac{\langle (1 + \exp\{\beta W + C\})^{-1} \rangle_s}{\langle (1 + \exp\{\beta W - C\})^{-1} \rangle_r} e^C, \quad (3.9)$$

其中  $\beta = \frac{1}{k_B T}$ ， $W$  为外界对分子做的功（拉伸时为正，回复时为负）， $\Delta G$  为分子自由能改变，下标  $s$  和  $r$  分别对应于自抑制茎环打开与回复的过程。公式中  $C = -\beta\Delta G + \ln(n_s/n_r)$ ，其中  $n_s$  和  $n_r$  分别是自抑制茎环结构打开和回复的样本数量。将计算得到的  $G_s$  与  $G_r$ （外界对自抑制茎环的做功，相当于  $W$ ），带入公式(3.9)就能得到自抑制茎环折叠的自由能  $\Delta G$ 。

在不含镁离子条件下，测量得到拉伸过程自由能为 176.2 kJ/mol，回复过程自由能为 162.8 kJ/mol，拉伸曲线计算的自由能略大于回复过程的自由能，与考虑过程中能量耗散后的结论一致。根据公式(3.9)得到无镁离子情况下 *rpoS* RNA 自抑制茎环结构自由能为 169.9 kJ/mol，略大于 MFold 软件预测(159.1 kJ/mol)，可能是因为在 MFold 软件中无法计算 three-way-junction 核心结构的自由能，导致预测值偏小。在 10 mM MgCl<sub>2</sub> 浓度下拉伸与回复得到的自由能分别为 206.2 kJ/mol 与 175.0 kJ/mol，根据公式(3.9)得到自由能为 190.4 kJ/mol，大于不含镁离子的情况，我们猜想是镁离子导致 three-way-junction 核心结构空间构象更加紧密所致。

### 3.4.3 自抑制茎环局部结构自由能计算

根据前文对自抑制茎环打开路径的分析,我们把“力-伸展”曲线中每一个锯齿结构与自抑制茎环二级结构对应起来。进一步计算出“力-伸展”曲线上每一个自抑制茎环局部结构打开或关闭过程中外界的做功,并利用公式(3.9)计算得到自抑制茎环局部结构的自由能。

选取自抑制茎环中两个较稳定结构(图 3-10 中 D2 和 D3-a),统计打开/回复过程做功并计算对应的自由能,再与理论预测值进行比较,结果如表 3-5 所示。实验测得的 D2 与 D3-a 结构吉布斯自由能与理论预测值接近,这说明光镊能精确地测量出 RNA 折叠的自由能。

表 3-5: 无镁离子时自抑制茎环局部结构的自由能

茎环	力 (pN)	长度 (nm)	自由能 (kJ/mole)	mfold 预测结果 (kJ/mole)
D3-a	11.74±0.49	8.86±1.61	48.3	51.61
D2	16.71±1.26	8.92±0.85	57.1	51.19

## 3.5 镁离子对 rpoS RNA 自抑制茎环的影响

通过实验数据处理与分析,统计出 rpoS RNA 自抑制茎环分为 1~4 次打开。通过计算外力做功得到自抑制茎环折叠的自由能。对比有无镁离子条件,总结出镁离子改变了自抑制茎环的空间结构,从而使自抑制茎环的 three-way-junction 核心部分结合更加紧密。X 射线小角散射结果与 AFM 结果也支持了该观点,证明镁离子会影响 rpoS RNA 5' UTR 的生物学功能。

### 3.5.1 小角 X 射线散射结果 (生物合作)

小角 X 射线散射 (SAXS) 是指当 X 射线透过试样时,在靠近原光束 2°~5° 小角度范围内发生的散射现象。小角 X 射线散射因可以方便地给出生物大分子轮廓信息而被广泛应用于生物大分子研究。通过小角 X 射线散射研究 rpoS RNA 自抑制茎环空间轮廓及在镁离子条件下外形的变化,有助于佐证光镊得到“镁离子改变了自抑制茎环空间结构”的结论。

小角 X 射线散射实验用的是上海国家蛋白质科学中心(NCPSS)的 BL19U2 光束, X 射线波长为 0.1033 nm。实验采集的数据按照标准程序在 ATSAS 软件包中进行分析。扣除缓冲散射后,利用 PRIMUS 对不同浓度的数据曲线进行缩放合并。然后使用 GNOM 估计 RNA 的粒子最大尺寸 ( $D_{max}$ )、真实空间  $R_g$ ,

并计算核苷酸对距离分布函数 (PDDF)。将自抑制茎环预测的模型 (20 种) 与实验采集到的数据进行匹配计算, 找到最合适的模型后使用 VMD 将其展示出来, 结果如图 3-13 C 所示, 自抑制茎环的结构在有镁和无镁环境有明显区别。

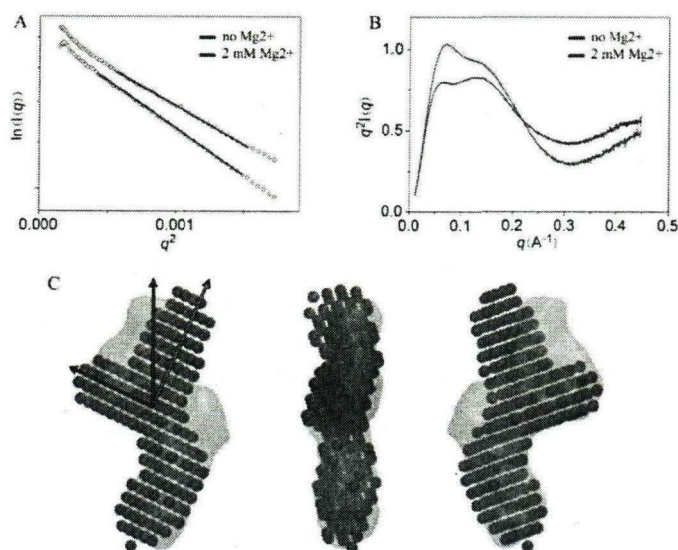


图 3-13 *rpoS* RNA 自抑制茎环的小角 X 射线散射结果。

A 图为 *rpoS* RNA 自抑制茎环区域的小角 X 射线散射曲线, 图中圆圈为采集数据点, 曲线为数据线性拟合曲线。B 图为 *rpoS* RNA 自抑制茎环的 Kratky 图。C 图为 *rpoS* RNA 自抑制茎环在有无镁离子环境中形态上的对比, 其中蓝色模型为不含镁离子溶液中结果, 红色模型为含有镁离子溶液中结果。

通过 Dammin 计算的 Ab initio 模型显示, *rpoS* RNA 自抑制茎环呈现典型的 three-way junction 拓扑学结构, 在没有镁离子的情况下形成了一个斜的“T”字形整体结构, 表明该 RNA 片段形成了稳定的三维折叠。

利用 RNA 三级结构预测软件 Mc-sym 对该自抑制茎环结构进行大量结构预测, 并使用实验小角曲线对这些预测结构的理论小角曲线进行筛选, 得到与实验曲线最为相符的外形结构如图 3-13 C 所示。当溶液中含有镁离子时, RNA 的构象变得更加紧凑, 同时两个短双链之间的空间取向发生了变化, 由“T”构型趋于“Y”构型, 这种变化通过小角 X 射线散射测量得到的参数粒子最大尺寸  $D_{\max}$  与真实空间  $R_g$  也能分析得到。这一实验结果提示我们, 镁离子导 three-way-junction 核心结构结合强度变化, 从而改变了两个双螺旋的取向。

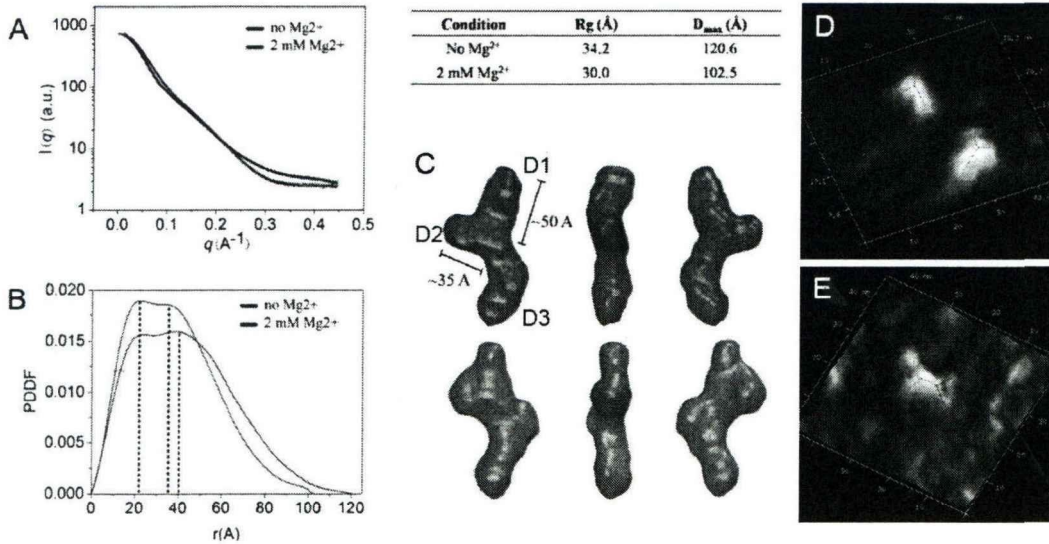


图 3-14 *rpoS* RNA 的空间结构与立体形貌。

A-C 为小角散射实验结果,深蓝色为无镁离子,红色为有镁离子。A 图为 *rpoS* RNA 自抑制茎环的一维散射曲线, B 图为核酸对距离分布函数 (PDDF) 曲线。C 为通过 Dammin 计算的 Ab initio *rpoS* RNA 自抑制茎环的立体模型。D 和 E 为 AFM 采集到的 *rpoS* RNA 自抑制茎环立体形貌,灰色虚线所示突起脊梁,红色虚线所示末端分叉。AFM 扫描范围  $1 \times 1 \mu m^2$ , 扫描频率 0.98 Hz, 分辨率为  $512 \times 512$  像素。

### 3.5.2 原子力显微镜结果

用原子力显微镜 (Atomic Force Microscopy, AFM) 观察折叠后自抑制茎环的外形,与光镊实验结果互相印证。原子力显微镜样品制作方法:

新鲜剥离的云母片 (Ted Pella,  $\phi 9.9mm$ ) 用  $10 \mu l$   $10 \mu g/ml$  多聚赖氨酸 (Sigma-Aldrich) 处理 1 分钟后用  $400 \mu l$  去离子水冲洗干净,使用压缩空气吹干。将转录得到的 87 个核苷酸 *rpoS* RNA 自抑制茎环用 HKE buffer ( $50 mM$  HEPES,  $100 mM$  KCl,  $1 mM$  EDTA, pH 7.5) 稀释至约  $1 ng/\mu l$ 。取  $10 \mu l$  自抑制茎环溶液滴在经多聚赖氨酸处理过的云母表面上,孵育 1 分钟后用  $400 \mu l$  去离子水冲洗。缓风吹干表面后放入真空干燥器,干燥约 30 小时后观察。

在 AFM (Digital Instrument, Santa Barbara, CA) 显微镜下采集图像,显微镜工作在轻敲模式 (tapping mode) 下,使用  $75 kHz$  氮化硅探针 (NSC18, MirkoMasch, San Jose, CA)。扫描范围为  $1 \times 1 \mu m^2$ , 扫描频率 0.98 Hz, 分辨率  $512 \times 512$  像素。成像结果如图 3-14 D~E 所示, AFM 图像也显示有 Y 型拓扑结构。图 3-14 E 中分叉现象与光镊所观察到的 D1 区域固有不稳定性相一致。



## 3.5.3 镁离子对自抑制茎环核心部分的影响

参考小角 X 射线散射结果与 AFM 的实验结果, 在有镁和无镁的情况下, three-way junction 三个茎环的基本结构没有改变。根据小角散射结果, 镁离子对自抑制茎环结构的改变主要体现在 D1 与 D2 茎环之间夹角的变化, 我们认为这一形貌的改变与自抑制茎环核心部分相互作用强度直接相关。

如图 3-15 所示, 有镁和无镁时自抑制茎环结构打开长度基本相同, 说明镁离子对核苷酸在三个茎环之间的分布没有明显的影响; 但镁离子明显增加了打开该结构所需要的外力, 这与 Bustamanta 研究结果是一致的。

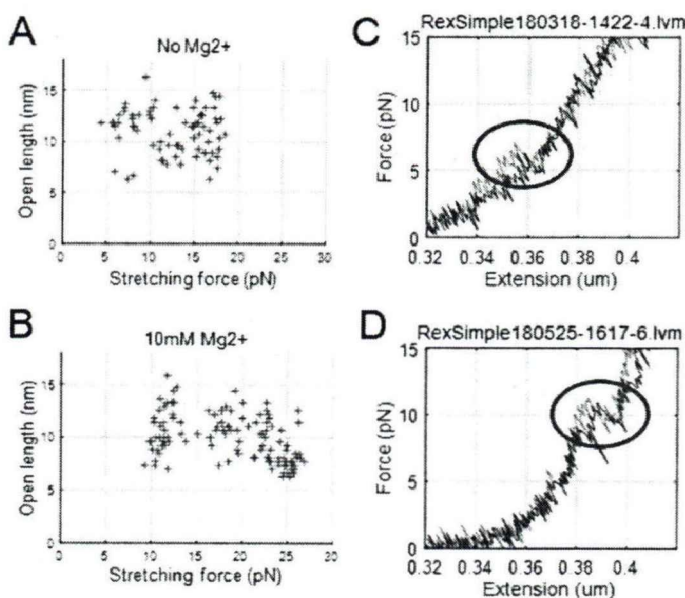


图 3-15 MgCl<sub>2</sub> 对自抑制茎环结构及力学特性的影响。

图 A 为不含镁离子和图 B 为含有镁离子自抑制茎环打开长度-打开外力统计分布; 其中横坐标为打开自抑制茎环结构的外力, 纵坐标为打开自抑制茎环结构的长度。C 和 D 分别为含有/不含镁离子条件下, 低力区的典型“力-伸展”曲线。红色曲线对应 D1 和核心区一起打开的过程, 蓝色曲线为 D1 与核心区分别打开的过程。

从图 3-15 看出, 自抑制茎环结构打开可以依据打开外力大小划分为低力和高力两个区域。无镁时这两个区域分界并不明显, 但当环境中存在镁离子时, 高力区和低力区明显分成两个部分, 而且高力区的分布相对较宽。结合自抑制茎环结构打开路径分析可知 (增加了 a→c→e→h 这一过程), 镁离子对三个茎环具有不同的增强效果, 对 D1 茎环的增强效果最弱。这使得低力区和高力区的分别更加明显, 高力区自抑制茎环打开力的分布进一步变宽。

实验曲线显示自抑制茎环首先在低力区存在一个打开过程。根据图 3-10 的路径分析, 该过程对应于 D1 茎环和自抑制茎环核心的核心区域。根据自抑制

茎环被打开的长度呈现两种不同的类型，一种打开长度较长，无镁时为 12 nm，有镁时为 14 nm，其长度值与自抑制茎环 D1 茎环和核心区域同时被打开的长度变化相当。另一种打开长度只有 6-7 nm，并且有些曲线中低力区先后出现两次 6-7 nm 的打开过程，如图 3-15 D 所示。通过与软件预测的二级结构进行比对，我们认为长度变化较短的打开事件对应于自抑制茎环核心区域被打开的过程。

对所有核心区域被打开的事件进行统计，利用 3.4.3 节中方法计算得到无镁时该区域对应的吉布斯自由能为 18.9 kJ/mole，与实验测得的自抑制茎环结构自由能减去 MFlod 预测的结构自由能 (17.1 kJ/mole) 差值相近，说明这个数值很有可能就是核心区域的自由能。当溶液中含有 10 mM MgCl<sub>2</sub> 时，计算得到的自由能为 40.8 kJ/mole，说明镁离子的存在增强了核心部分内部相互作用。

#### 3.5.4 镁离子对自抑制茎环的影响

加入镁离子后光镊测量到核心部分的自由能增加了一倍，我们认为这一变化是 D1 和 D2 茎环轴线被弯折的主要原因。有研究显示 D2 茎环的末端存在一个 Hfq 蛋白的结合位点，结合在这个位置的蛋白会进一步招募 sRNA，帮助 sRNA 与 D1 茎环相互作用以释放 SD 区域。同时 D1 内部相对较弱的相互作用起到类似钥匙孔的作用，为 sRNA 的介入提供最初的附着位点。我们认为镁离子导致的结构弯折减小了 D1 和 D2 之间夹角，拉近了 D1 茎环与蛋白招募来的小分子 RNA 间的距离，帮助被招募到 Hfq 蛋白上的小分子 RNA 与 D1 茎环接触（如图 3-16 D 所示）并开启基因表达。

小角 X 射线散射的结果也表明，镁离子使自抑制茎环核心部分变得更加紧凑，D1 和 D2 两个茎环之间的角度减小约 30°，如图 3-16 A-B 所示。这种改变为招募 Hfq 蛋白提供了方便，Hfq 蛋白六聚体通过侧面结合在 D2 茎环末端，使得 *rpoS* RNA 与 sRNA 相结合。

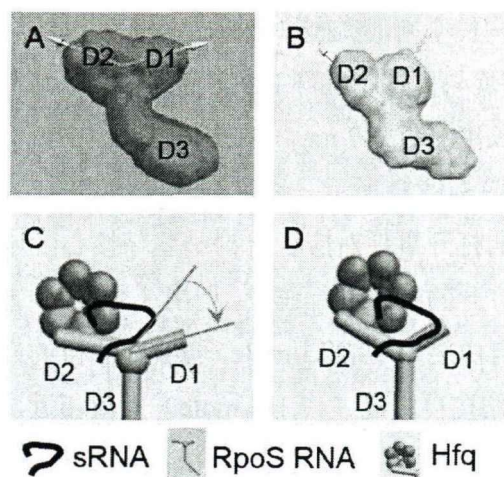


图 3-16 镁离子改变自抑制茎环结构对功能的影响。

图中 D1, D2, D3 为自抑制茎环的三个茎环, 箭头表示 D1 和 D2 茎环相对茎环核心区 II 的方向, 图 A 和 C 无镁情形, B 和 D 有镁情形。A 和 B 为根据小角 X 射线散射结果构建的自抑制茎环立体示意图; C 和 D 展示镁离子减小了 D1 和 D2 的夹角, 使得蛋白招募到的 sRNA 与 D1 茎环相接触的示意图。

RNA 的结构与功能一直是生命科学研究的热点, 由于技术手段的限制, 单一的研究方法通常只能了解到生物分子某些侧面的信息。本研究在小角 X 射线散射和 AFM 提供 *rpoS* RNA 自抑制茎环外形信息的基础上, 应用光镊技术有针对性地进一步研究了自抑制茎环的精细结构。通过将测量得到的结构打开长度同软件预测的二级结构相对照, 得到了自抑制茎环的打开路径。并进一步计算出了精细结构打开所需自由能, 帮助人们从自由能角度理解镁离子对自抑制茎环结构的影响。这种对自抑制茎环结构与功能的分析方法可推广至其他 RNA 结构与功能研究之中。

### 3.6 本章小结

本章研究将结构生物学、显微影像法和单分子定量测量技术结合起来, 鉴于二价金属离子会明显改变核酸的分子结构, 分别在存在和不存在镁离子的情况下对 *rpoS* RNA 自抑制茎环进行研究。首先利用 SAXS 计算模型和 AFM 成像法取得形貌特征, 然后利用光镊施加外力的方法从单分子层次剖析其结构, 定量测量自抑制茎环结构打开过程中的精细过程与自由能。通过多种方法从不同的角度相互印证分析, 能更精准地认识 *rpoS* RNA 自抑制茎环结构及镁离子对自抑制茎环结构的影响, 对进一步研究 sRNA 与 Hfq 蛋白如何重启 *ropS* RNA

表达奠定了基础。



## 第4章 光镊研究着丝粒相关蛋白

本章的研究对象为着丝粒相关蛋白 CENP-E、CENP-T 与 CENP-W。CENP-E 是一种驱动蛋白，它能沿着微管进行行走，帮助细胞在有丝分裂过程中将染色体平均分配成两部分。用光镊研究小分子抑制剂对 CENP-E 的抑制机理，有助于将抑制剂应用于有丝分裂研究与肿瘤化学治疗中。CENP-T/W 这两种蛋白则是构成动点的重要分子机器，他们之间会相互作用并结合，从而连接动点的内层与外层。借助光镊能从单分子水平上研究磷酸化对 CENP-T/W 蛋白结合强度的影响，有助于人们理解细胞如何通过磷酸化等分子修饰来精细调控有丝分裂过程，确保遗传物质在两个子代细胞中精确分配。

### 4.1 CENP-E 与其小分子抑制剂研究

人们对驱动蛋白-1 进行了近 30 年的研究，对其了解深入，但是作为驱动蛋白家族的另一种驱动蛋白——CENP-E 人们所知还比较有限，因此我们借助光镊研究了 CENP-E 在负载力下的行走行为，得到了 CENP-E 的动力学特性特性，并与驱动蛋白-1 的动力学特性进行了对照。借助光镊测量 CENP-E 动力学特性的方法，研究了两种小分子抑制剂 GSK 与 syntelin 的抑制效果，并推测其制机理。

#### 4.1.1 样品制备与观察

为了研究 CENP-E 的运动特性，需要纯化 CENP-E 蛋白和驱动蛋白-1 作为实验对照。因为只保留了蛋白 N 端的功能区域，共 560 个氨基酸，所以将这种驱动蛋白-1 记为 K560。使用的 CENP-E 也并非全长的 CENP-E 蛋白，只保留了它 N 端的功能区域，共 473 个氨基酸，后文依然记为 CENP-E。

K560 与 CENP-E 均由大肠杆菌进行表达，用 Ni-NTA 琼脂糖树脂方法进行提纯。首先将离心后的细胞裂解液通过树脂柱，用 K560/CENP-E 尾部 His 标签与镍的结合将蛋白挂在树脂柱上，其余分子则顺利通过树脂柱随缓冲液流出。用洗脱缓冲液 (elution buffer, 25 mM pipes, 300 mM KCl, 200 mM imidazole, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA) 将 K560/CENP-E 洗脱、用 BRB80 缓冲液(80 mM K-Pipes, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM EGTA, pH 6.8) 进行脱盐处理，完成提纯。

最后在溶液中加入 10% 的蔗糖，分装到离心管中使用液氮速冻后，放入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中长期保存。

根据实验需求聚合不带荧光的微管纤维或带有荧光的微管纤维。用 BRB80 缓冲液配置 10 mg/ml 无标记微管蛋白(含有  $\alpha$ -微管蛋白与  $\beta$ -微管蛋白)、在  $37^{\circ}\text{C}$  下孵育 30 分钟让微管蛋白聚合成微管纤维、加入紫杉醇 (Taxol) 用于稳定微管，阻止微管解聚。最后将微管纤维分装到离心管中使用液氮速冻后，放入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中长期保存。如果制备带有荧光的微管纤维，只需在样品中加入 5 mg/ml 带有罗丹明标记的微管蛋白即可。

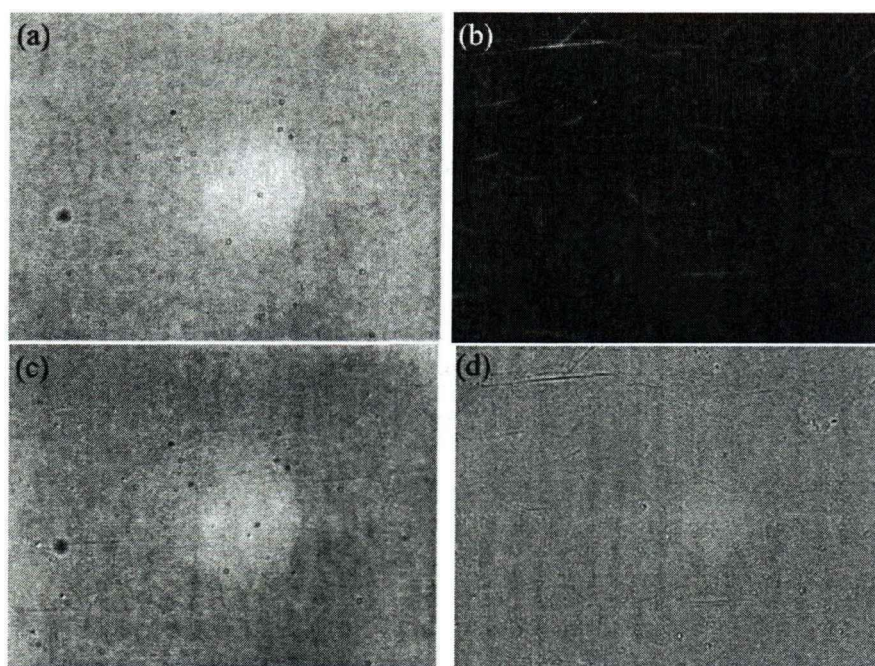


图 4-1 粘底微管纤维成像结果。

(a) 图为明场下微管成像效果。(b) 图为荧光下微管成像效果。(c) 图为 DIC 成像下微管成像效果。(d) 图为通过取平均方式降噪后的微管成像效果。

单根微管纤维粗细为 22~25 nm，小于可见光的衍射极限，这使得实验中观察微管成为了一个问题。我们使用荧光成像、微分干涉 (Differential interference method, DIC) 成像与平均降噪方法来实现微管的观察并进行实验。成像结果如图 4-1 所示，将微管通过化学键的方式固定在样品室的底面上，观察成像效果。图 4-1 (a) 为明场下的微管成像效果，因为微管仅有 22~25 nm 粗细难以观察到。采用原位的荧光成像，结果如图 4-1 (b) 所示，样品室底面是粘连有大量微管，发现有些微管并不是单根微管，而是多根并合在一起的，但这并不影响研究驱动蛋白沿微管行走的动力学特性。考虑到光镊实验多在明场下进行，荧光成像使得实验操作非常繁琐，因此 Block 等人采取了 DIC 成像的方法对微

管进行观察, 结果如图 4-1 (c) 所示, 可见一些较粗的微管束在 DIC 成像中被清楚的辨识。然而 DIC 成像中使用了诺马斯基 (Nomarski) 棱镜将照明光分成 o 光与 e 光两束, 激光经过该元件也会被分成两束, 于是光镊光斑变为两个光斑干涉的结果, 不再具有圆对称性, 这使光镊的标定变得非常复杂。进一步考虑到可能被成像感知到的较粗微管束信号在不均匀照明光与相机噪声下被淹没, 我们尝试通过拍摄多张照片取平均, 然后扣除背景的方法来得到对细节的感知, 成像结果如图 4-1 (d) 所示。在 10 张图片取平均下观察到较粗的微管, 这无疑大大降低了研究驱动蛋白动力学特性实验的难度。

#### 4.1.2 K560 与 CENP-E 动力学特性

在具备了研究驱动蛋白条件后, 我们研究了 K560 与 CENP-E 这两种驱动蛋白的动力学特性。将聚合好的微管束通过化学修饰偶联在样品室底面上, 再将驱动蛋白偶联在带有羧基的微球上 (驱动蛋白自身会与羧基产生偶联), 光镊操控微球让驱动蛋白靠近微管。我们观测到了驱动蛋白靠近微管并与微管接触后沿微管行走的现象, 如图 4-2 (a) 所示, 微球刚开始处于光阱中心位置, 随着驱动蛋白的行走, 微球偏离光阱中心, 偏移量由光镊测量, 即得到驱动蛋白的运动曲线, 这样可以进一步研究驱动蛋白的动力学特性。

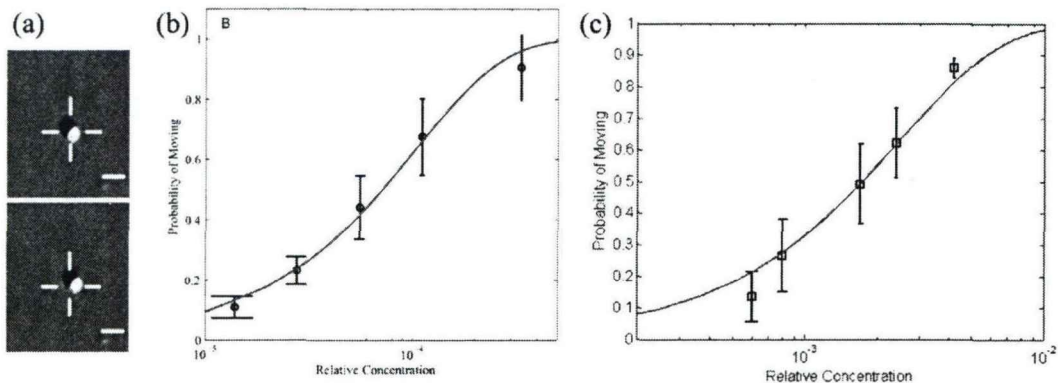


图 4-2 驱动蛋白运动图像与运动概率图。

(a) 图为 K560 沿微管运动的实验图像, 图中白色十字中心为光镊中心, 比例尺 1 μm。  
(b) 图为携带有 K560 蛋白的微球靠近微管后, 驱动蛋白产生运动的概率与 K560 蛋白浓度相关, 图中红线为按照函数形式  $P(c)=1-e^{-\lambda c}$  对数据的拟合结果。(c) 图为 CENP-E 运动概率随 CENP-E 蛋白相对浓度变化曲线。

在研究驱动蛋白动力学特性前, 先统计了驱动蛋白的行走概率, 确定驱动蛋白与微管接触后是否会开始行走。驱动蛋白行走概率与驱动蛋白相对浓度有关系, 一般满足  $P(c)=1-e^{-\lambda c}$  分布。因此调节驱动蛋白浓度, 改变每个微球上



驱动蛋白的数量,进一步测量得到驱动蛋白的运动概率也是实验重要结果之一。图 4-2 (b) 与 (c) 分别对应于 K560 与 CENP-E 在不同蛋白浓度下运动概率,图中红色曲线为数据的拟合曲线,可以看出驱动蛋白运动概率变化趋势与理论预期一致。不仅如此,因为希望观察到的是单个驱动蛋白的行走曲线,而不是多个驱动蛋白的竞争行走过程,所以我们将实验中驱动蛋白行走概率控制在 50% 以下以保证绝大多数运动为单分子行为。

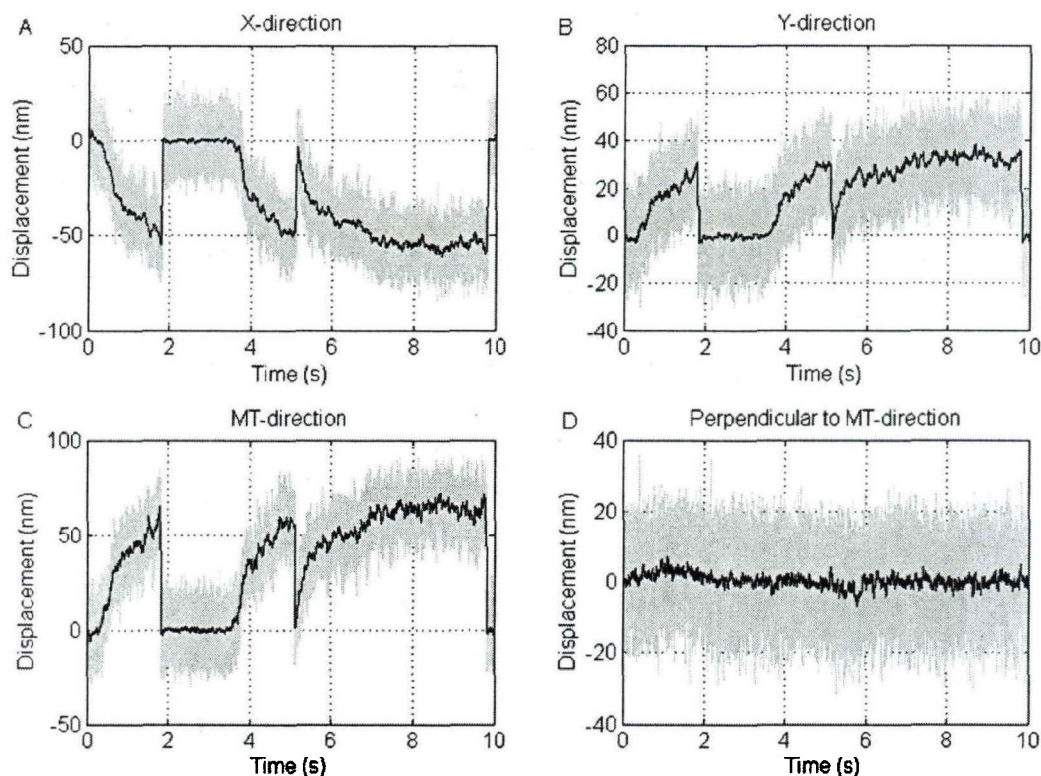


图 4-3 PSD 采集驱动蛋白运动曲线。

图中是通过 PSD 采集的微球在光阱中位置随时间变化曲线,即为驱动蛋白的运动曲线。(a) - (b) 图分别为 PSD 在 X 方向与 Y 方向采集到的驱动蛋白运动曲线,(c) - (d) 图为驱动蛋白在沿微管方向运动曲线与垂直微管方向运动曲线。图中灰色曲线为原始位置数据,黑色曲线为滤波后的位置曲线,其中横坐标为时间,单位秒,纵坐标为距离,单位纳米。

图 4-3 是实验中采集到的驱动蛋白行走曲线,因为微管的方向有一定随机性,所以 PSD 采集的信号在 X、Y 方向均存在分量,如图 4-3 (a) - (b) 所示。为了得到驱动蛋白沿微管方向的运动曲线,需要计算出微管与 X、Y 方向的夹角,然后旋转坐标轴,得到驱动蛋白沿微管方向的运动与垂直微管方向的运动,结果如图 4-3 (c) - (d) 所示,垂直微管方向运动分量消失。驱动蛋白的运动曲线表明,驱动蛋白运动速度与负载力成负相关,负载力越大,驱动蛋白运动

速度越慢，当驱动蛋白上负载力达到一定阈值后，便会被光镊从微管上拉下来，与微管解离。我们对运动曲线进行分区域处理，分别计算在每一个区域中驱动蛋白的运动速度与负载力的关系。分区域的方式有两种，一种是等时间间隔，即将运动曲线横坐标等长分割，计算驱动蛋白在一定时间内运动的距离；另外一种方式是等距离间隔，即将运动曲线的纵坐标等长分割，计算驱动蛋白运动一定距离所需要的时间，处理过程如图 4-4 (a) 所示，图中用不同颜色曲线标记了每一段首尾点相连的线段，线段斜率为驱动蛋白运动速度，线段中点为该段的平均负载力。

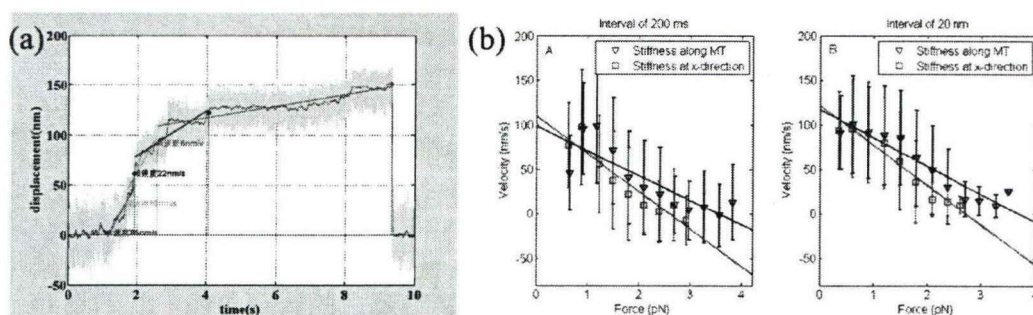


图 4-4 K560 驱动蛋白运动曲线分析方式与结果。

(a) 图为 K560 驱动蛋白的运动速度计算方式，图中灰色为原始位置数据，蓝色为滤波后的位置曲线，横坐标为时间，单位秒，纵坐标为距离，单位纳米。(b) 图为 K560 驱动蛋白运动速度随负载力变化的曲线图，图中横坐标为负载力的大小，单位 pN，纵坐标为 K560 驱动蛋白运动速度，单位 nm/s。左右两张图片分别对应于时间分段或距离分段的数据处理方式。

两种不同分段方式对驱动蛋白运动曲线进行数据处理并做统计，得到图 4-4 (b) 所示的驱动蛋白运动速度随负载力变化曲线。在 200 毫秒的等时间间隔处理方法下，对统计得到的数据点进行线性拟合，拟合曲线与横坐标的交点是速度为 0 时的负载力，即最大负载力；拟合曲线与纵坐标的交点是负载力为 0 时的速度，即最大运动速度。统计了 66 例 K560 驱动蛋白的运动曲线，ATP 浓度为 20  $\mu\text{mol}$ ，最大运动速度为 98.3 nm/s，最大负载力为 3.6 pN。用 20 nm 等距离间隔处理方法下，对统计得到的数据点同样做线性拟合处理，最大运动速度为 116.8 nm/s，最大负载力为 3.7 pN。由此可见两种数据处理方法得到的结果相近，结论一致。

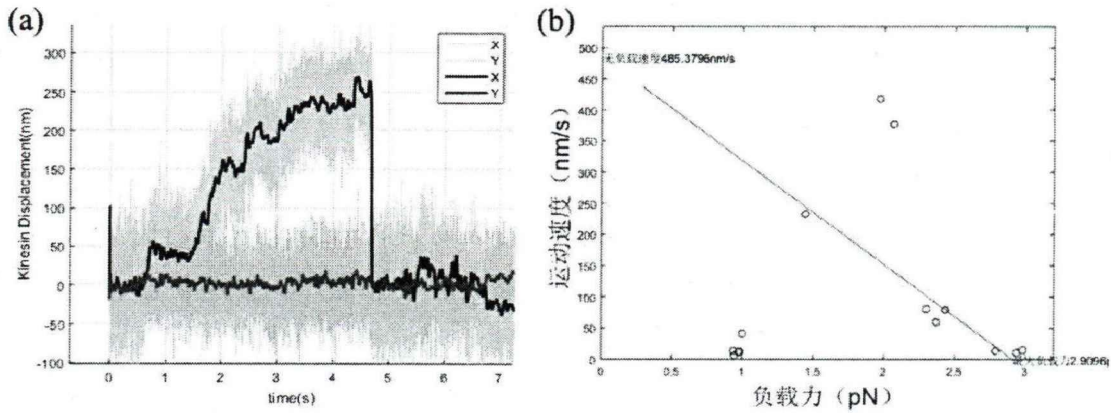


图 4-5 CENP-E 蛋白运动曲线与数据处理结果。

(a) 图为 CENP-E 驱动蛋白沿微管运动数据曲线，图中灰色与浅红色为原始位置数据，黑色为滤波后沿微管方向运动曲线，红色为滤波后垂直微管方向运动曲线，横坐标为时间，单位秒，纵坐标为距离，单位纳米。(b) CENP-E 运动速度随负载力变化曲线，横坐标为负载力，单位 pN，纵坐标为 CENP-E 蛋白运动速度，单位 nm/s。

进一步尝试，用相同的方法研究 CENP-E 驱动蛋白的运动曲线，其结果并不理想。CENP-E 的运动曲线如图 4-5 (a) 所示，虽然曲线整体形状与 K560 运动曲线形状类似，发现 CENP-E 在行走一段距离后会突然停下来“休息”片刻，在曲线上形成一段平台。这种现象在低 ATP 浓度(110  $\mu\text{mol}$ )和高 ATP 浓度(1.33 mmol) 都存在，所以这应该是 CENP-E 自身的运动特性所致。CENP-E 的这种运动特性给数据处理带来了很大的困难，因为在进行分段处理数据时，如果这一段中拥有一段平台数据，那么这一段的运动速度就会变得很低甚至趋近于 0，统计结果如图 4-5 (b) 所示，数据点离散，使线性拟合的可信度大大降低，无法得到最大运动速度与最大负载力。

这种情况下，只能计算 CENP-E 运动的平均速度。我们对比了 CENP-E 的平均运动速度随 ATP 浓度变化的影响。在 110  $\mu\text{mol}$  ATP 浓度下，CENP-E 的平均运动速度约 30 nm/s；在 1.33 mmol ATP 浓度下，CENP-E 的平均运动速度约 100 nm/s，更高的 ATP 浓度下，CENP-E 运动速度不再增加。由此可知 1.33 mmol ATP 浓度已经超过了 CENP-E 运动的饱和浓度，同时发现 CENP-E 即使在饱和 ATP 浓度下，平均运动速度依然远低于驱动蛋白-1 的运动速度(约 400 nm/s~800 nm/s)。

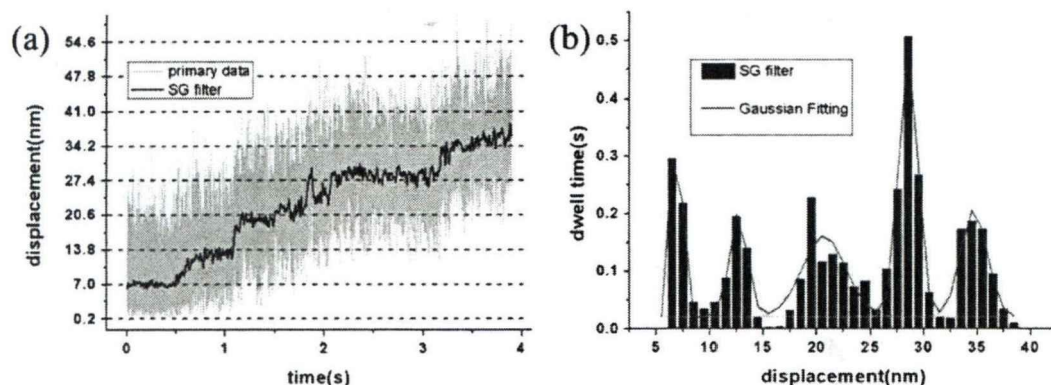


图 4-6 K560 驱动蛋白行走精细过程。

为 K560 驱动蛋白行走的精细过程，图中黄色为原始数据，蓝色为滤波后的位置曲线，其中横坐标为时间，单位秒，纵坐标为距离，单位纳米。(b) 图为对 (a) 图中位置曲线做统计，得到停留时间随蛋白位置的变化曲线，横坐标为 K560 的位置，单位纳米，纵坐标为 K560 在该位置驻留时间长度，单位为秒。

研究驱动蛋白行走的精细过程时，降低 ATP 浓度至 20  $\mu\text{mol}$ ，K560 的行走速度会变得很慢，能观察到 K560 单步步进的过程，如图 4-6 (a) 所示。K560 的行走步长约为 8.2 nm，行走到下个位置后会停留一段时间，等待下一个 ATP 过来参与反应后再行走下一步，在行走曲线上形成一些短小的平台。对驱动蛋白的位置做统计直方分布图，如图 4-6 (b) 所示，尖峰间距离约 8.2 nm，对应于 K560 行走的单步步长，进一步说明 K560 是步进行走。

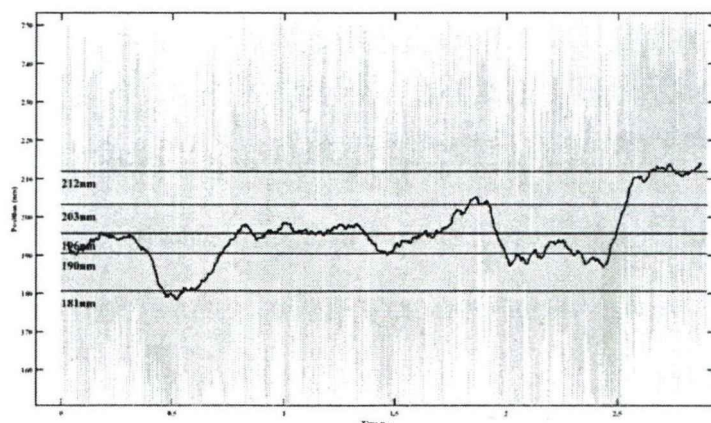


图 4-7 CENP-E 驱动蛋白行走精细过程。

图中灰色为原始数据，黑色为滤波后的数据，红色为驱动蛋白停留平台的位置。

CENP-E 驱动蛋白行走精细过程，如图 4-7 所示。图中截取的是 CENP-E 行走曲线中高负载力的区域。因为在较高的负载力下，CENP-E 行走速度很慢，

更容易观察到单步行走的过程。驱动蛋白的行走步长约 8 nm，与 K560 的行走步长 8.2 nm 十分接近。我们还观察到 CENP-E 的后退行为，即行走中向后退 1~2 步的现象，这在 K560 的实验中并没有观察到，但因为数据量较小，有待进一步验证。

#### 4.1.3 GSK 与 Syntelin 抑制机理研究

目前有两种 CENP-E 的小分子抑制剂，一种是 GSK-923295 (简称为 GSK)，是美国 APEX BIO 公司的产品，目前已经研究的比较充分；另外一种是 syntelin，研究还比较有限。在上节的 CENP-E 实验中，在样品中加入抑制剂会抑制 CENP-E 的行走，可能是完全阻断 CENP-E 的行走，也可能只是改变了 CENP-E 的行走特性。通过光镊可以观察 CENP-E 在负载力下的动力学特性变化，帮助人们推测抑制剂的抑制机理。

当向正常行走的 CENP-E 实验体系中加入 20  $\mu\text{mol}$  GSK 后，CENP-E 完全被抑制。将携带有 CENP-E 的微球靠近微管时，微球立刻粘连在微管之上，无法移动。当 GSK 的浓度下降为 20 nmol 后，观察到 83.3% 的案例正常运动，16.7% 则与被抑制现象相同，粘连在微管上。由此可知 CENP-E 对于 GSK 非常敏感，20  $\mu\text{mol}$  条件完全抑制了 CENP-E 的行为。利用光镊将已经粘连在微管上微球拉下来，测量其与微管的解离力。结果发现多数情况下，光镊的力不足以将微球与微管分离，即解离力大于光镊所能提供的最大光阱力；(另外一部分数据则是会将微管从样品室底面拉拽脱离下来，这部分数据后面不做为统计案例)。在加入 GSK 后，CENP-E 与微管间解离力统计图如图 4-8 所示，可见大多数解离力大于 15 pN，远大于 CENP-E 在行走中的最大解离力 (约 2.9 pN)。

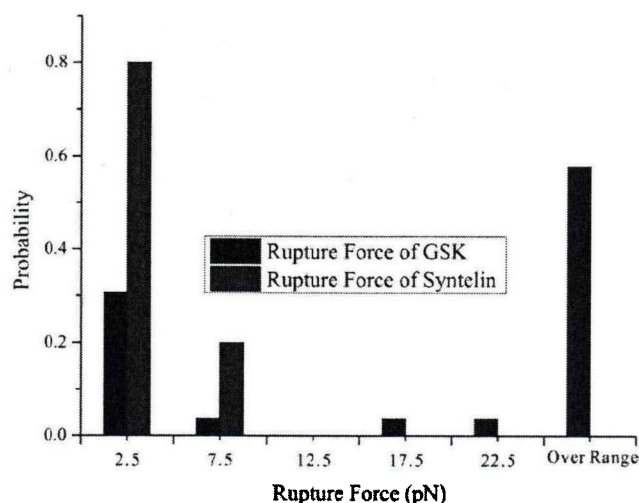


图 4-8 驱动蛋白与微管解离力统计图。

图中展示了 CENP-E 在 GSK 与 Syntelin 抑制剂作用下, CENP-E 与微管间解离力的统计分布, 横坐标为解离力大小, 单位 pN, 纵坐标为频率。

2002 年 Toyoshima 等人的研究表明, 当驱动蛋白行走过程中 ATP 的水解被阻断, 驱动蛋白会与微管粘连在一起, 驱动蛋白与微管间单脚解离力约 9.7 pN, 双脚解离力约 17 pN (详见 1.4.3 节)。我们的实验结果表明, 在 GSK 抑制后, CENP-E 与微管之间存在一个很强的连接; 同时考虑到 CENP-E 行走时的解离力仅为 2.9 pN 左右, 所以 GSK 应该是起到了与 AMP-PNP 类似的效果, 阻止了 ATP 的水解过程, 从而实现抑制 CENP-E 的行走。这个结论与 Jackson 等人使用生化研究手段得到的研究结论一致 (详见 1.4.4 节)。

与研究 GSK 抑制机理方式类似, 我们研究了 syntelin 的抑制效果。实验发现 syntelin 的抑制效果与 GSK 截然不同。在溶液中加入 400  $\mu\text{mol}$  ATP 与 40  $\mu\text{mol}$  syntelin 之后, 只有约 17.6% 的 CENP-E 粘连在微管上, 而且一部分微球基本在 3~5 秒后便自动脱离, 是一种比较弱的连接; 另一部分被从微管上拉下来的平均解离力在 3 pN 左右, 如图 4-8 所示, 表明这种连接比较脆弱。这个解离力与 ADP 结合下, 驱动蛋白与微管的解离力相近, 因此我们猜测 syntelin 是抑制了 CENP-E·ADP 从微管上的脱离从而达到抑制 CENP-E 行走的效果。

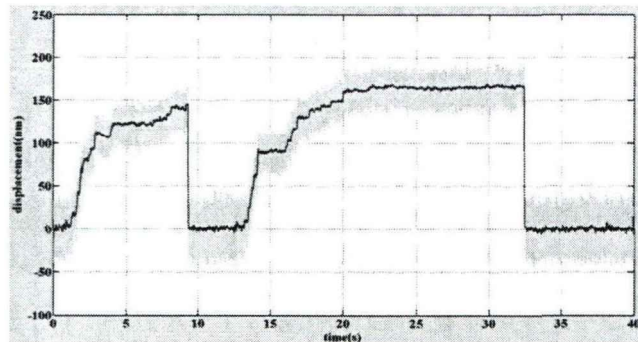


图 4-9 syntelin 抑制下 CENP-E 的运动曲线。

图中横坐标为时间, 单位秒, 纵坐标为 CENP-E 的位移, 单位纳米。

然而另外 82.4% 的 CENP-E 则可以正常进行行走, syntelin 抑制下的 CENP-E 运动曲线如图 4-9 所示。被抑制的 CENP-E 会形成更长的驻留平台, 会在行走一段距离后停下来“休息”更长的时间, 可能是 syntelin 在 CENP-E 运动过程中结合在上面, 抑制了行走。但因为是弱结合, 所以在一段时间后, CENP-E 可以重新恢复行走。这与细胞实验中, syntelin 抑制剂可以在被洗脱后, 恢复细胞的正常有丝分裂结果吻合。

我们研究了 ATP 浓度对 syntelin 抑制效果的影响, 结果如表 4-1 所示。

表 4-1: 不同实验条件下, CENP-E 运动速度统计表

	平均运动时间 (s)	平均运动位移 ( $\mu\text{m}$ )	平均运动速度 ( $\mu\text{m/s}$ )
400 $\mu\text{M}$ ATP	2.45	0.173	0.130
400 $\mu\text{M}$ ATP Syntelin	1.73	0.165	0.155
100 $\mu\text{M}$ ATP	3.50	0.251	0.104
100 $\mu\text{M}$ ATP Syntelin	11.2	0.224	0.042

表格数据所示, 在高 ATP 浓度下 (400  $\mu\text{mol}$ ), syntelin 的加入并没有减慢 CENP-E 的平均运动速度, 但是在低 ATP 浓度下 (100  $\mu\text{mol}$ ), syntelin 的加入很大程度上减慢了 CENP-E 的平均运动速度, 抑制效果增加。推测 syntelin 是在 CENP-E 运动过程中结合上去的, 而不是在开始运动前就与 CENP-E 结合。

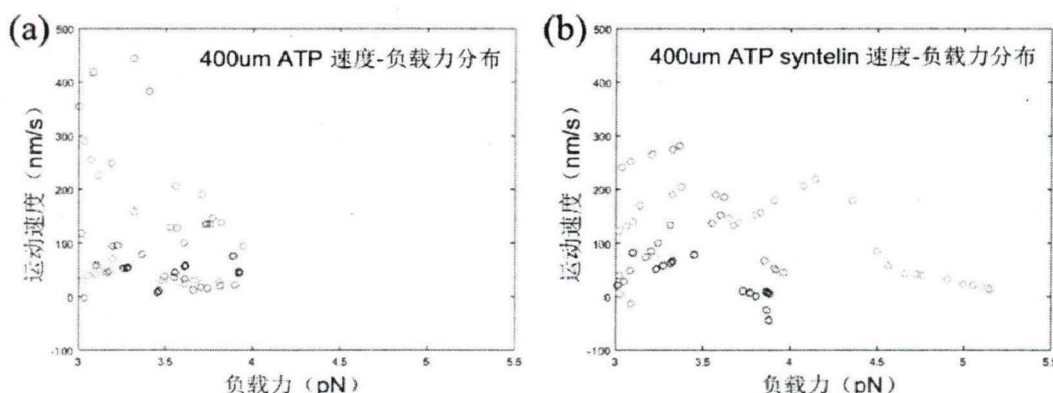


图 4-10 CENP-E 在有无 syntelin 下的运动速度-负载力分布图。

(a) 图为 400  $\mu\text{mol}$  ATP 浓度下 CENP-E 在高负载力区的运动速度分布图, 横坐标为负载力大小, 单位 pN, 纵坐标为的运动速度, 单位 nm/s。(b) 图为存在 syntelin 抑制剂情况下, CENP-E 的运动速度-负载力分布图。

对运动曲线进行细致的分析, 统计了 CENP-E 运动曲线在高负载力下运动速度。是否加入 syntelin 条件下, 结果如图 4-10 所示。容易发现, 在未加入 syntelin 时, CENP-E 在大于 3 pN 的负载力下, 平均速度为 98.9 nm/s; 在加入 syntelin 后, CENP-E 在大于 3 pN 的负载力下, 平均速度为 80.5 nm/s, 速度明显降低。考虑到细胞内是一个 ATP 浓度很高且有较高负载力的环境, 所以我们怀疑负载力起到拖慢运动周期的作用, 从而提供更多的时间帮助 syntelin 与 CENP-E 结合, 达到抑制作用。

#### 4.1.4 CENP-E 突变体动力学特性

鉴于 2010 年 Cleveland 等人报道 Aurora 激酶会将 CENP-E 磷酸化或者去磷

酸化从而影响 CENP-E 的生物学功能，我们用光镊研究 CENP-E 突变体的动力学特性得知 Aurora 激酶对 CENP-E 生物学功能的影响。

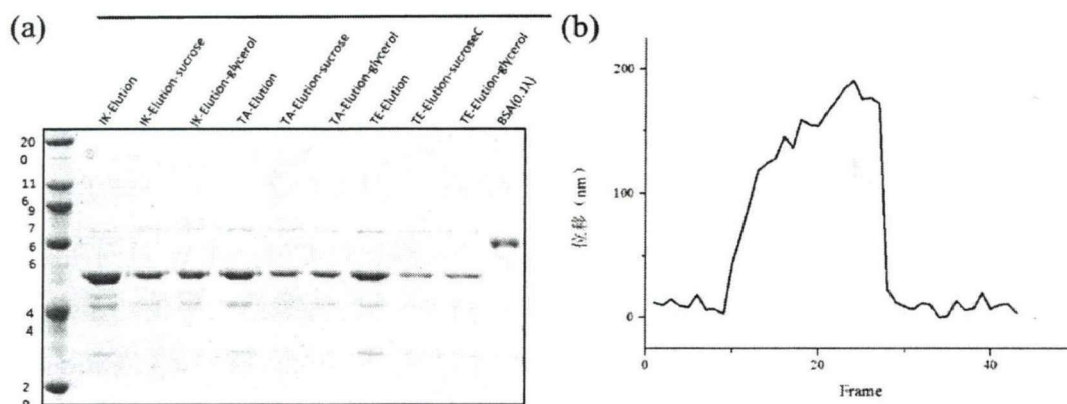


图 4-11 CENP-E 突变体跑胶结果与不能磷酸化突变体运动曲线。

(a) 为 CENP-E 的封闭 GSK 结合位点突变体 (IK)、不能磷酸化突变体 (TA) 与已经磷酸化突变体 (TE) 跑胶结果图。(b) 为 TA 突变体沿微管运动曲线。

制备了三种 CENP-E 突变体，TA 突变体对应于不能磷酸化的 CENP-E，TE 突变体对应于已经磷酸化的 CENP-E，IK 突变体对应于封闭了 GSK 结合位点的 CENP-E，三种突变体的凝胶电泳结果如图 4-11 (a) 所示。

实验发现，野生型 CENP-E 在  $0.3 \text{ ng}/\mu\text{l}$  蛋白浓度下拥有 86.8% 运动概率，TA 突变体在  $12 \text{ ng}/\mu\text{l}$  浓度下仅有 6.1% 的运动概率，115 例中仅有 7 例运动，运动概率远低于未突变的情况，运动曲线如图 4-11 (b) 所示，估计不能磷酸化突变会导致 CENP-E 蛋白结构上的改变，减弱了与 ATP 或微管的结合能力。

TE 突变体在  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  浓度下，微球靠近微管后没有相互作用，因此我们判断 CENP-E 磷酸化后，明显削弱了与微管的相互作用。

IK 突变体在存在 ATP、不存在 GSK 的环境中，既不能在微管上行走，也无法与微管结合，蛋白性状和野生型 CENP-E 有比较大的区别：IK 突变体非常容易促使微球凝聚。因此我们推测 IK 这种突变给 CENP-E 结构造成了很大的影响，使 CENP-E 丧失了功能。

## 4.2 CENP-T/W 间相互作用

测量蛋白间的结合强度也是光镊非常擅长研究的单分子问题，本节研究了 CENP-T 与 CENP-W 这两种蛋白之间的结合强度。首先将 CENP-T/W 分别偶联



在不同的微球之上,为了避免微球间靠的太近,将 CENP-T/W 各连接一段 1.7 kbp 长的 DNA 手柄, DNA 手柄通过特异性偶联连接在微球上, 然后进行光镊实验。通过对拉伸得到的曲线进行分析, 发现得到的现象与实验设计并不吻合, 暴露了这种 CENP-T/W 与 DNA 偶联方式存在的问题, 并进一步通过查找数据库证明了这种偶联方式的不可行性。

#### 4.2.1 CENP-T/W 偶联方案

考虑到蛋白本身长度很短, 只有几十纳米长, 因此在 CENP-T/W 蛋白两端各连接一段 1.7 kbp 长的 DNA 手柄, 使得光镊进行拉伸时微球间有一定的距离。制备的 CENP-T/W 蛋白尾部带有谷胱甘肽巯基转移酶 (Glutathione S-transferase, GST), 借助 GST 与还原型谷胱甘肽的特异性结合完成偶联。BM(PEG)<sub>2</sub> 交联剂将谷胱甘肽与 DNA 尾端连接, 其分子结构如图 4-12 (a) 所示。该分子两端各有一个马来酰亚胺结构, 与巯基发生化学反应形成共价键偶联, 方式如图 4-12 (b) 所示。谷胱甘肽中的半胱氨酸拥有活性的巯基, 容易与 BM(PEG)<sub>2</sub> 相连。制备 DNA 手柄, 用带有巯基修饰的引物, 将 DNA-BM(PEG)<sub>2</sub>-谷胱甘肽-GTS-CENP-T/W 偶联在一起。

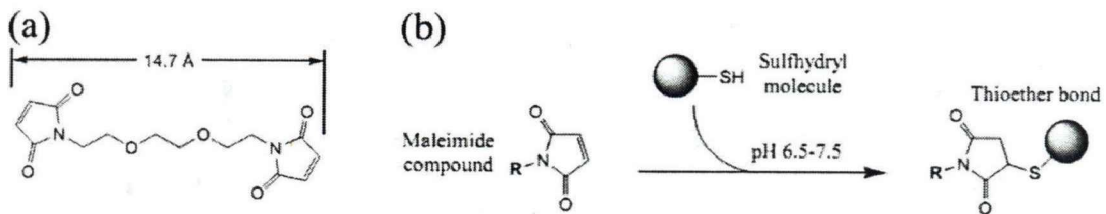


图 4-12 BM(PEG)<sub>2</sub> 偶联示意图。

(a) 图为分子结构图, (b) 为马来酰亚胺结构与巯基偶联示意图。

#### 4.2.2 CENP-T/W 拉伸方案

将 CENP-T/W 偶联在 DNA 手柄上后, 只需要将 DNA 手柄的另一端连接在微球上即可, 即用链霉亲和素与生物素间的特异性偶联。用 PCR 制备 DNA 手柄时, 选取修饰有生物素的引物将生物素修饰在 DNA 手柄尾部, 选取修饰有链霉亲和素的两种不同大小微球 (约 2.16 μm 与约 1.07 μm) 即可。

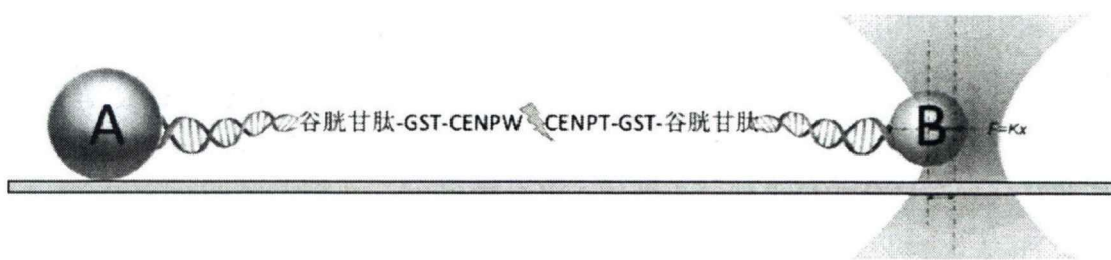


图 4-13 CENP-T/W 与 DNA 和微球偶联示意图。

直径约  $2.16\ \mu\text{m}$  的 A 球粘连在样品室底面，通过 DNA 手柄与 CENP-W 相连，B 球为被光镊捕获与拉伸的探针，直径约  $1.07\ \mu\text{m}$ ，通过 DNA 手柄与 CENP-T 相连。

光镊拉伸实验方案如图 4-13 所示。A 球粘连在样品室底面，DNA 手柄通过特异性偶联连接在上面。用交联剂  $\text{BM}(\text{PEG})_2$  将 DNA 另一末端的巯基与谷胱甘肽上的巯基偶联，再利用谷胱甘肽与 GST 的特异性连接将 CENP-W 连接在 DNA 手柄上。CENP-T 的偶联与 CENP-W 相同，衔接在直径约  $1.07\ \mu\text{m}$  的 B 球上，B 球处于悬浮状态，为光镊捕获后进行拉伸。耦合链的分子总长度为  $1.13\ \mu\text{m}$ ，即两球之间的距离。

实验中我们首先以较小的阈值 ( $15\ \text{pN}$ ) 进行几次预拉伸：在微球间发现相互作用后，增大光镊的拉力并观察 DNA 的伸长，当力大于等于  $15\ \text{pN}$  时便停止拉伸，逐渐减小光镊力，让 DNA 回复。这样安排的目的是获得  $0\text{-}5\ \text{pN}$  范围内 DNA 手柄的力-伸展曲线，通过对曲线进行蠕虫链模型拟合可以判断是否为单分子行为；另外反复受力-释放过程以保证 CENP-W/T 的充分结合。在预拉伸试验基础上，将施力的阈值增大到  $100\ \text{pN}$  以上，此时光镊一直拉伸直到连接断裂，记录从拉伸到断裂的全部曲线，用于计算断裂力。

### 4.2.3 力谱曲线分析

对拉伸曲线进行整理分析，发现主要有两类 CENP-T/W 拉伸曲线，一类有力平台，一类没有力平台。有力平台的 CENP-T/W 拉伸曲线如图 4-14 所示。

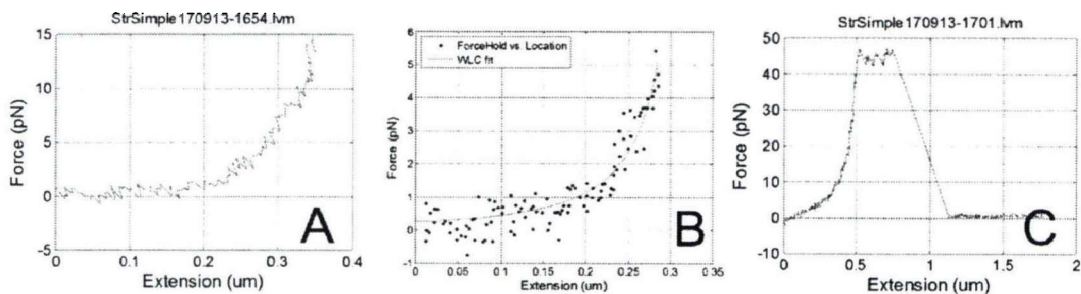


图 4-14 有力平台的 CENP-T/W 拉伸曲线。

图中横坐标为拉伸长度，单位微米，纵坐标为分子两端加载的外力，单位  $\text{pN}$ 。其

中 A 图为预拉伸的拉伸曲线，拉伸截止阈值为 15pN； B 图为预拉伸曲线的蠕虫链拟合结果（红线表示），拟合的保守长度为 48.83 nm， C 图为拉断分子的拉伸曲线。

存在力平台的拉伸曲线：当光镊力达到 40 pN 左右，曲线会出现一个平台，然后断开。对预拉伸曲线进行蠕虫链拟合的效果很好，保守长度为 48.83 nm，与单根 DNA 的理论值比较接近，可以认为是单分子的数据曲线。

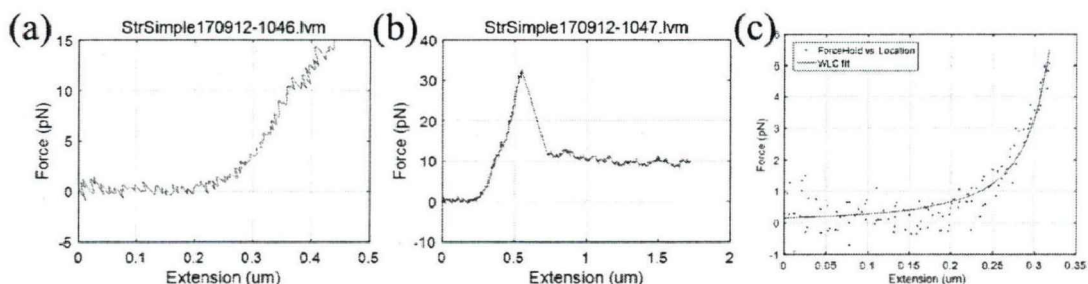


图 4-15 没有力平台的 CENP-T/W 拉伸曲线。

图中横坐标为光镊进行拉伸的长度，单位微米，纵坐标为分子两端加载的外力，单位 pN。其中 A 图为预拉伸曲线，拉伸截止阈值为 15pN； B 图为拉断分子的拉伸曲线； C 图为预拉伸曲线的蠕虫链拟合（红线表示），拟合的保守长度为 66.95 nm。

没有力平台的拉伸曲线，在 25~35 pN 就断裂，如图 4-15 所示。预拉伸曲线证实这类曲线也是单分子行为。

对所有数据曲线进行分类统计，结果如表 4-2 所示，其中不能进行蠕虫链拟合的曲线不确定为单分子行为，不在讨论范围之内。

表 4-2 CENP-T/W 拉伸曲线分类表

拉伸曲线蠕虫链模型拟合	能拟合	能拟合	不能	不能	能拟合与不能拟合
	有力平台	直接断开	直接断开（低力）	直接断开（高力）	不能确定为单分子
实验数量	4	2	6	7	4
断裂力 pN	41.12	28.3	13.5	40.93	40.68
平台长度 nm	289	-	-	-	-

开始我们猜想平台的出现是 CENP-T/W 肽链被拉直所致，然后发现 CENP-T/W 的肽链均拉直长度也无法达到 289 nm，所以否定了这个原因。进一步我们猜测可能是 DNA 的拉伸变性平台，但是 41.1 pN 的平台高度低于 65 pN 的变性曲线平台高度。通过进一步查找问题，发现是实验中微球贴近样品室底面，此时粘滞系数需要计入流体动力学修正误差，修正公式如下<sup>[129]</sup>：

$$\eta'(T) = \frac{\eta(T)}{\left[ 1 - \frac{9}{16} \left( \frac{r}{h} \right) + \frac{1}{8} \left( \frac{r}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left( \frac{r}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left( \frac{r}{h} \right)^5 \right]}, \quad (4.1)$$

公式中  $r$  为微球的半径,  $h$  为微球距离样品室底面高度。在修正粘滞系数后, 平台高度为 65 pN 左右, 证明了这是 DNA 的拉伸相变平台。

通过对拉伸曲线的分析, 发现拉伸分子的总长度与两段 DNA 手柄长度一致; 同时得到了 DNA 的拉伸变性曲线, 在接近 70 pN 的力下才会断裂。难道 CENP-T/W 之间的相互作用有如此牢固吗? 进一步进行了凝胶电泳验证。

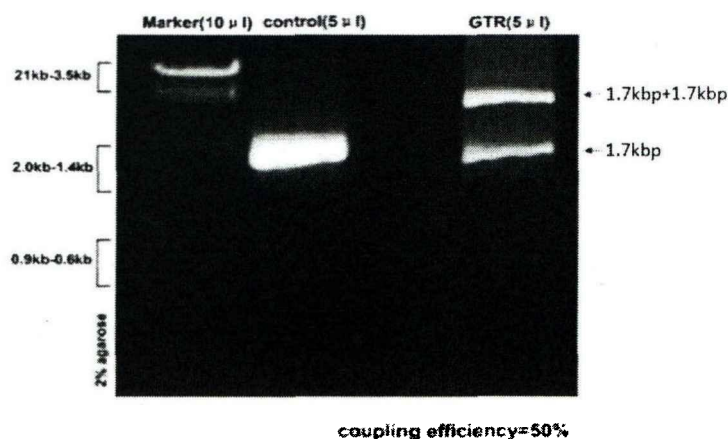


图 4-16 1.7 kbp DNA 与偶联有谷胱甘肽的 1.7 kbp DNA 跑胶图。

其中对照组为 1.7 kbp DNA 手柄的条带, GTR 为偶联有谷胱甘肽的 1.7 kbp DNA 手柄条带。

1.7 kbp DNA 手柄与偶联有谷胱甘肽的 1.7 kbp DNA 手柄凝胶电泳图如图 4-16 所示, 可以看出偶联有谷胱甘肽的 DNA 手柄明显多出一个条带, 条带长度约为 3.4 kbp, 因此我们推测在进行 DNA 尾端谷胱甘肽修饰的过程中, 1.7 kbp DNA 手柄形成了二聚体, 这很可能是谷胱甘肽上的活性巯基间形成了二硫键。



图 4-17 谷胱甘肽与 GST 偶联空间结构图 (PDB code: 5LCZ)。

在后续调研中发现, 谷胱甘肽与 GST 结合后的空间结构图如图 4-17 所示。

图中红圈内的黄色原子团代表谷胱甘肽的巯基，红圈内的蓝色原子团代表谷胱甘肽的末端氨基，容易发现这两个基团都参与了和 GST 的结合，所以当我们偶联时占用了巯基或氨基基团，会使谷胱甘肽丧失或降低与 GST 的结合能力，所以这种偶联方案并不可行。

### 4.3 本章小结

本章主要介绍了光镊研究驱动蛋白行走与蛋白间相互作用力的实验研究结果。首先我们利用光镊测量了驱动蛋白-1 与 CENP-E 的运动曲线，通过对运动曲线的分析得到了驱动蛋白-1 与 CENP-E 的最大运动速度和最大负载力等动力学参数，发现在饱和 ATP 浓度下，CENP-E 的运动速度一般低于驱动蛋白-1 的运动速度。进一步，我们还探究了两种小分子抑制剂 GSK 与 Syntelin 对 CENP-E 的抑制机理，这是生化中非常关心又难以研究的动态过程。研究发现在加入 GSK 后，CENP-E 会与微管粘连在一起，由此推断 GSK 阻断了 ATP 水解为 ADP 的过程。在加入 syntelin 后，CENP-E 与微管间只存在很弱的连接，估计是 syntelin 抑制了 CENP-E·ADP 从微管上的脱离使得 CENP-E 失去行走的能力。同时发现 CENP-E 在高负载力下的运动速度明显减慢，说明 ATP 浓度影响 syntelin 的抑制效果，由此推测 Syntelin 是在 CENP-E 运动过程中结合在上面的。我们还测量了 CENP-T/W 之间的解离力，由此判断二者的结合强度。为了完成断裂力的精准测量，我们提出了一种借助于 DNA 手柄将 CENP-T/W 偶联在微球间的实验方案。然而光镊拉伸曲线与 DNA 手柄的凝胶电泳结果均表明偶联过程中出现了意外的化学键连接，进一步通过调研否定了这种偶联方法的可行性。

## 第 5 章 单像素相位成像

单像素成像技术通过借助结构光照明与单像素光强探测实现对物体成像。成像过程中一系列随时间变化的结构光照明物体，物体与结构光作用产生光斑的总光强被单像素探测器（例如光电探测器 PD、光电倍增管 PMT 等）收集。然后，通过关联结构光的图案与光强信号可计算重构物体图像。单像素探测器拥有非常广谱的探测波长，在红外、太赫兹和 X 光波段有着阵列探测器无法比拟的优势。同时，单像素探测器拥有很高的量子效率，在弱光探测、保密量子通讯中非常有应用潜力。此外，单像素成像兼容压缩感知技术，这可以显著减少成像时的采样数量，避免相机成像时的信息冗余与浪费，实现在动态成像的同时完成信息压缩工作。单像素成像不仅可以成像物体的振幅，也可以同时成像物体的振幅与相位。相位成像对于折射率的变化非常敏感，因此是研究界面性质、表面形貌与物质相变的良好手段。

我们提出了一种基于傅里叶频谱采集的单像素相位成像方法。该方法需要不同入射角度的平面波照明，因此依赖于快速的复杂光场调制技术。考虑到调制速度，我们选取数字微镜设备（Digital Micromirror Device, DMD）作为空间光调制器。DMD 作为二值化振幅调制器件，生成复杂光场需要采用二值化全息术。二值化全息术中，Lee 方法常被用于复杂场的编码。鉴于 Lee 方法生成复杂光场的保真度较低，我们提出使用误差扩散算法优化 Lee 方法，提高复杂结构光场生成的保真度。进一步，我们基于高速 DMD 生成具有不同波矢的平面波照明实现了单像素相位成像，并结合压缩感知技术提高了成像速度。

### 5.1 优化的 Lee 算法

DMD 相较于常见的液晶空间光调制器，拥有超快的切换速度与低廉的价格，因而在复杂空间光场生成中具有优势。DMD 借助 Lee 相位图能够实现光场复振幅同时调制<sup>[130]</sup>。Lee 相位图是二值化的相位图，传统的 Lee 方法是对灰度相位图直接进行固定阈值二值化，这种二值化方法丢失了很多信息并产生周期性结构，生成的光场保真度比较低。为了克服 Lee 方法的不足，我们提出使用误差扩散算法对 Lee 方法进行优化。

## 5.1.1 Lee 方法编码复杂光场

DMD 是一种二值化振幅型空间光调制器, 需要借助二值化相位图调制复杂光场, 即振幅和相位同时调制。复杂光场的复振幅为:

$$s(x, y) = A(x, y) \exp(i\phi(x, y)), \quad (4.2)$$

其中  $A(x, y) \in [0, 1]$  是归一化的振幅分布,  $\phi(x, y) \in [-\pi, \pi]$  对应复杂光场的相位分布。二值化全息图实际是一个周期性阵列结构的二值化光栅, 在数学上, 二值化的振幅型光栅可表示为傅里叶级数的叠加, 形式如下:

$$T(x, y) = \sum_n \frac{\sin(\pi n q)}{\pi n} \exp[in(2\pi(u_0 x + v_0 y) + 2\pi\delta)], \quad (4.3)$$

其中  $(u_0, v_0)$  是光栅的空间频率。光栅由宽度为  $qT$  ( $q \in [0, 1]$ ) 的矩形脉冲组成, 脉冲的周期为  $T$ , 其中  $u_0^2 + v_0^2 = 1/T^2$ 。  $\delta \in [-1/2, 1/2]$  为脉冲在每个周期内的相对位置。假如一个单色平面波  $U_{in}$  入射这个光栅, 其一级 ( $n=1$ ) 衍射光场为:

$$U_1(x, y) = U_{in} \times \frac{\sin(\pi q)}{\pi} \exp(i2\pi\delta), \quad (4.4)$$

公式(4.4)中的  $q$  和  $\delta$  是常数参量, 它们可表示为位置坐标的函数  $q(x, y)$  和  $\delta(x, y)$ 。只要位置函数变化比光栅周期小, 公式(4.3)就能够保持足够精确。因此, 我们可以设置这两个函数为:

$$q(x, y) = \frac{1}{\pi} \arcsin(A(x, y)), \quad \delta(x, y) = \frac{\phi(x, y)}{2\pi}, \quad (4.5)$$

这两个函数分别编码了光场  $s(x, y)$  的振幅分布与相位分布, 其中  $\phi \in [-\pi, \pi]$ 。此时二值化光栅的一级衍射光场就代表了目标光场。

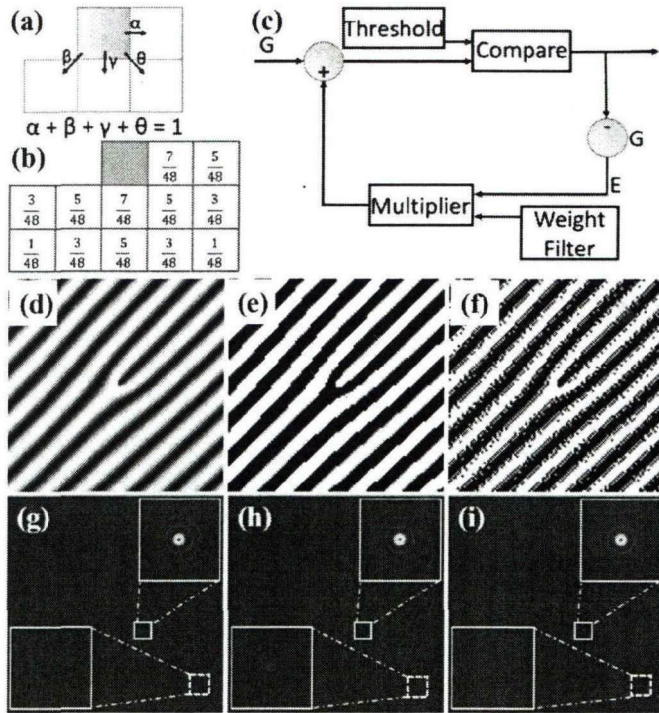


图 5-1 误差扩散算法原理和 Lee 相位图的改进。

(a) - (c) 为误差扩散算法的原理示意图，(d) 为生成拓扑荷等于 1 ( $l=1$ ) 涡旋光束的灰度全息图，(e) - (f) 为 Lee 方法与误差扩散算法优化 Lee 算法生成的二值化全息图，(g) - (i) 为 (d) - (f) 三幅全息图对应的频谱。图中右上角的插图为一二级频谱的放大图，左下角的插图为更高的衍射级次，容易看出误差扩散算法可以显著抑制不需要的衍射级次和二值化噪声。

由此可知，我们只需要计算公式(4.3)表示的振幅型光栅，生成对应的全息图即可实现任意复杂光场的调制。这个二值化的振幅型全息图可以通过 Lee 方法计算得到。Lee 方法精确产生了一个归一化透过率函数为：

$$h(x, y) = H[\cos(2\pi(u_0x + v_0y) - 2\pi\delta(x, y)) - \cos(\pi q(x, y))], \quad (4.6)$$

其中  $H(x)$  是 Heaviside 阶跃函数，定义如下：

$$H(x) \equiv \begin{cases} 0 & \text{if } x < 0 \\ 1 & \text{if } x \geq 0 \end{cases}, \quad (4.7)$$

根据公式(4.5)-(4.7)计算得到的二进制全息图，加载在 DMD 上以便调制光场得到目标光场。

Lee 方法通过加入一个偏置函数  $\cos(\pi q(x, y))$  将振幅波动引入正弦曲线中，然后用零阈值进行判断，完成二值化过程。但是这种固定阈值二值化方法在全



息图的边界处引入很大误差,会产生一些周期性结构。例如, DMD 加载图 5-1 (d) 中的灰度叉形光栅能够生成拓扑荷为 1 ( $l=1$ ) 的涡旋光束。利用 Lee 方法计算二值化全息图结果如图 5-1 (e) 所示。与灰度图相比,该全息图表现出明显的锐利边界,这些边界导致其傅里叶频谱中出现了多余的衍射级次,如图 5-1 (h) 所示。此外,我们还观察到一级光斑周围存在很多不连续的结构,这些误差不可避免地影响了复杂光场调制的精度。

### 5.1.2 优化的 Lee 方法

为了使用振幅型二值化全息图实现精确的复杂光场调制,我们引入了误差扩散算法来取代传统的固定阈值二值化过程,从而减少此过程中二值化相位图与灰度相位图之间的总误差。

误差扩散算法最初是为数字图像处理而开发的,有很多种成熟的算法。这里采用的误差扩散算法是 J. F. Jarvis 等人提出的“最小化平均误差”算法,该算法每次选择 12 个相邻像素进行处理,其误差权重显示在图 5-1 (b) 的格子中。在进行误差扩散处理前,先将要处理的灰度相位图灰度值归一化。如图 5-1 (a) 所示,蓝色像素表示当前正在处理的像素,白色相邻像素表示待处理的像素。从蓝色像素到白色像素的扩散误差由给定的权重决定,所有权重之和为 1,处理方向为从左到右,从上到下。图 5-1 (c) 给出了具体的算法执行过程,首先比较蓝色像素值和阈值大小,在多数情况下阈值被选择为 0.5,如果像素值大于阈值,则设为 1,否则为 0。然后,将原始值与二值化后的值之差乘以给定的误差权重滤波器,计算邻域的扩散误差。最后将相邻像素的原始值和扩散误差相加,得到更新后的值。如果某个像素在二值化过程中变为 1,那么它的临近像素更有可能变为 0,这样处理之后,总体误差接近于 0。

使用误差扩散算法对图 5-1 (d) 的灰度全息图进行了处理,得到结果如图 5-1 (f) 所示。对比图 5-1 (e) 发现,采用误差扩散算法可以消除固定阈值二值化产生的非自然边界与不连续结构。进一步,我们计算了这三种全息图的傅里叶频谱,并在图 5-1 (g) - (i) 中给出了它们的分布。很明显,误差扩散算法可以显著地抑制不需要的衍射级次和二值化噪声,如插图所示。同时该方法得到的傅里叶频谱与灰度全息图的傅里叶频谱非常接近,这说明误差扩散算法优化了二值化全息图,为空间光场生成提供了一种更为准确的方法。

### 5.1.3 仿真结果

为了准确编码复杂光场，我们使用优化的 Lee 方法计算用于生成 OAM 光束的二值化全息图，生成的 OAM 光束包括 LG 光束、贝塞尔光束和 ANG (angular) 光束。ANG 光束是一种混合的 OAM 光束，其复振幅为：

$$\theta_{j,N_l}(r,\phi) = \frac{1}{\sqrt{2N_l+1}} \sum_{-l}^l u_l(r,\phi) e^{-i2\pi jl/(2N_l+1)}, \quad (4.8)$$

其中  $u_l(r,\phi)$  是具有螺旋相位波前的涡旋模式， $N_l$  是参与叠加的模式总数。

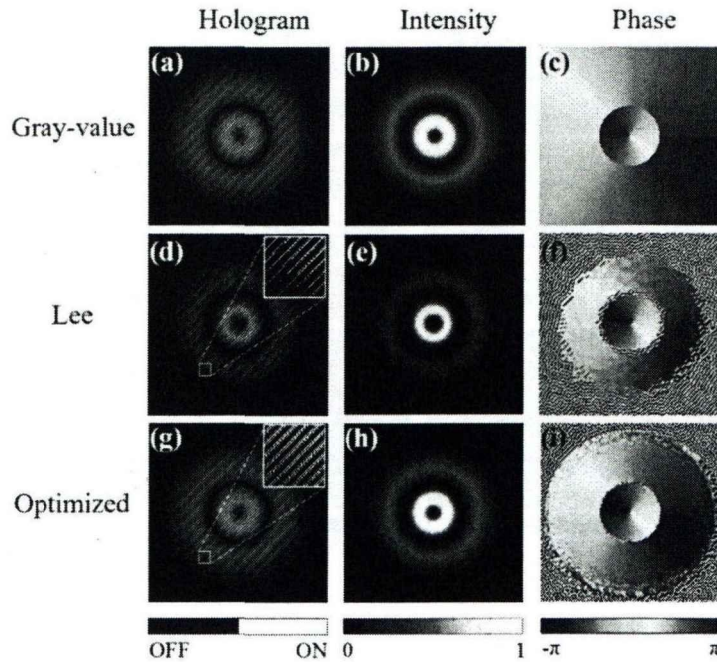


图 5-2 LG<sub>11</sub> 模式仿真模拟结果。

(a)、(d)、(g) 是用于生成 LG<sub>11</sub> 模式的全息图，分别对应于灰度全息图、Lee 方法全息图与优化后 Lee 方法全息图，插图是二值化全息图的部分放大图。(b)、(e)、(h) 分别是三种方法仿真模拟得到的 LG<sub>11</sub> 模式强度分布，其中强度进行了归一化处理，(c)、(f)、(i) 分别是三种方法仿真模拟得到的 LG<sub>11</sub> 模式相位分布。

作为对比，我们使用仿真手段对 Lee 方法与优化的 Lee 方法生成 OAM 光束进行了研究。根据 LG 模式的理论振幅和相位分布（图 5-2 (b) 和 (c)）计算出其灰度全息图，如图 5-2 (a) 所示，基于 Lee 方法与优化的 Lee 方法分别计算出二值化全息图，如图 5-2 (d) 和图 5-2 (g) 所示。用 Lee 方法计算得到的全息图可以观察到圆环周围的周期性结构和锐利的边界，而优化的 Lee 方法得到了更光滑的二值化全息图。

我们对这两种相位图调制光场的效果进行计算比较。方法是先对二值化相位图进行傅里叶变换，然后利用圆形空间滤波器滤波得到一级衍射光分布，最

后使用逆傅里叶变换计算生成的光场。图 5-2 (e)、图 5-2 (h)、图 5-2 (f) 和图 5-2 (i) 分别展示了计算的光场强度与相位分布。显然, 优化方法成功地减小了 Lee 方法产生的锐利边界和周期性结构, 大大提高了光场生成的质量。此外, 我们还应用该方法生成了贝塞尔光束, 其数值仿真结果如图 5-3 所示。可以看出, 应用误差扩散算法优化可以得到高质量的贝塞尔光束。

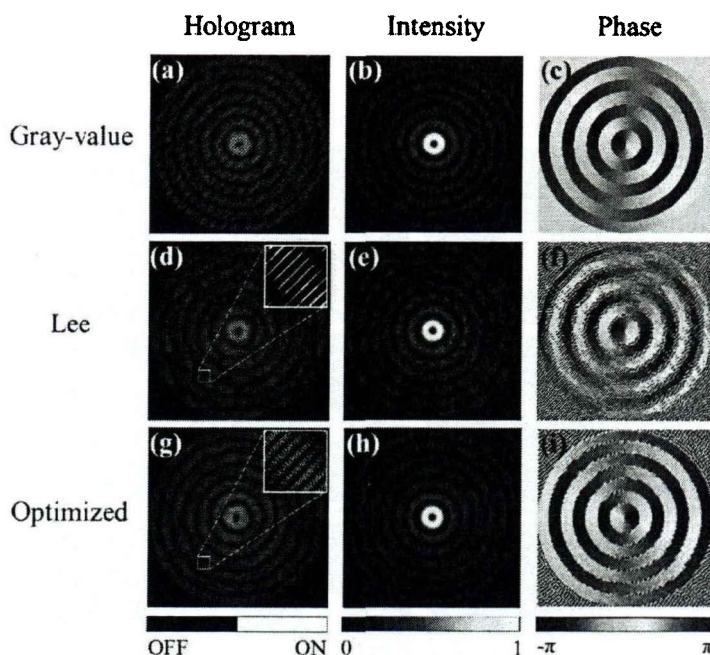


图 5-3 贝塞尔光束仿真模拟结果。

(a)、(d)、(g) 是用于生成贝塞尔光束的全息图, 分别对应于灰度全息图、Lee 方法全息图与优化后 Lee 方法全息图, 插图是二值化全息图的部分放大图。(b)、(e)、(h) 分别是三种方法仿真模拟得到的贝塞尔光束强度分布, 其中强度进行了归一化处理, (c)、(f)、(i) 分别是三种方法仿真模拟得到的贝塞尔光束相位分布。

为了定量评价该方法调制光场精度, 我们计算了光场的保真度  $F = |E_{\text{target}}^* E_{\text{obtained}}|$ , 其中  $E_{\text{target}}$  为目标场,  $E_{\text{obtained}}$  为生成得到的光场。表 5-1 列出了两种方法生成的不同参数 LG 模式、贝塞尔模式和 ANG 模式保真度。结果表明, 对光场复振幅调制时, 优化的 Lee 方法保真度较高。对于所有测试的 OAM 光场, 计算出的保真度至少可以达到  $F > 0.985$ 。尽管这两种方法很多情况下都具有高保真度, 但它会因光束参数变化而略有不同。这些参数决定了光束结构的复杂性与编码的难度, 只有满足振幅和相位分布变化比光栅周期慢得多时, 光场才能准确编码。例如, LG 模式的复杂程度随  $p$  参数的增大而增加, 这导致了 LG 模式的保真度随  $p$  参数的增大而降低。总而言之, 优化的 Lee 方法减小

了 Lee 方法中存在的误差，特别是消除了 Lee 全息图中的周期性结构。

表 5-1: 两种方法生成 OAM 模式光场的保真度

LG mode					
Parameter ( $l, p$ )	(1, 0)	(1, 1)	(1, 2)	(1, 3)	(1, 4)
Lee	0.9686	0.9616	0.9525	0.9410	0.9356
Error Diffusion	0.9950	0.9930	0.9905	0.9878	0.9859
Bessel mode					
Parameter $l$	1	2	3	4	5
Lee	0.9294	0.9505	0.9634	0.9674	0.9736
Error Diffusion	0.9854	0.9866	0.9911	0.9894	0.9933
ANG mode					
Parameter $N_l$	3	5	7	9	11
Lee	0.9753	0.9653	0.9443	0.9173	0.8885
Error Diffusion	0.9967	0.9953	0.9936	0.9918	0.9901

### 5.1.4 实验结果

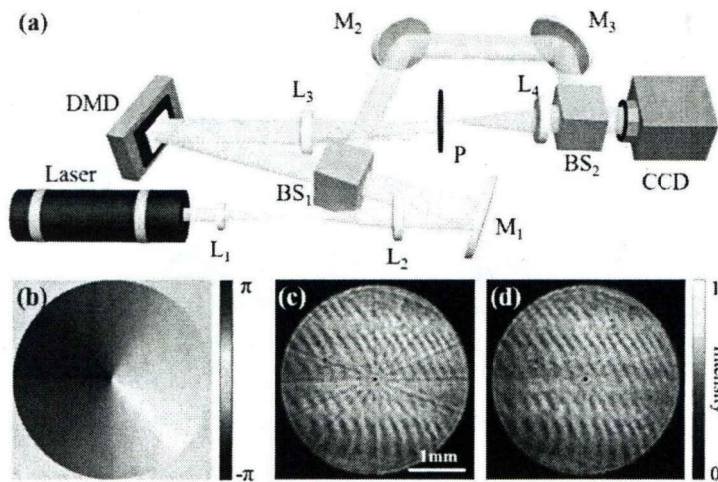


图 5-4 误差扩散算法优化 Lee 方法实验装置图。

(a) 图为优化的 Lee 方法实验装置图，图中 L 为透镜，M 为反射镜，BS 为分光棱镜，P 为小孔。(b) 为需要生成的相位分布。(c) - (d) 分别为使用 Lee 方法与优化后 Lee 方法生成的相位涡旋光场 ( $l=1$ ) 振幅分布。

为了证明提出方法的可行性，我们利用在 DMD 上加载计算得到的二值化全息图生成 OAM 光束。实验采用的 DMD 型号为 ALP 4395，产自德国 Vialux 公司，它拥有  $1920 \times 1080$  像素的全高清分辨率和高达 17.8 kHz 的切换速度。基于优化的 Lee 算法，DMD 实现了 OAM 光束的高保真度生成与动态切换。实验装置示意图如图 5-4(a) 所示，光源是波长为 633 nm 的氩氖激光器 (EW-250B, Eachwave Scientific Instrument)，出射  $TEM_{00}$  模式的激光。为了充分照明 DMD

靶面，实验中激光光束需要扩束并以  $24^\circ$  的入射角照射以达到 DMD 最佳调制效率。Lee 方法调制复杂光场时采用的是一级衍射光，因此我们采用  $4-f$  系统并在其傅里叶平面进行小孔滤波。在  $4-f$  系统成像平面上 CCD 相机(PL-D752MU, PixeLINK)记录目标光场的强度分布。光场相位的测量借助马赫-曾德尔干涉仪，通过生成光场与平面波的干涉提取其相位信息。

图 5-4 (c) 和图 5-4 (d) 展示了两种方法生成纯相位涡旋 ( $l=1$ ) 的强度分布，图 5-4 (b) 展示了纯相位涡旋的理想相位分布。Lee 法得到的强度分布中可以观察到一些径向的黑线，优化的 Lee 方法消除了这个误差。

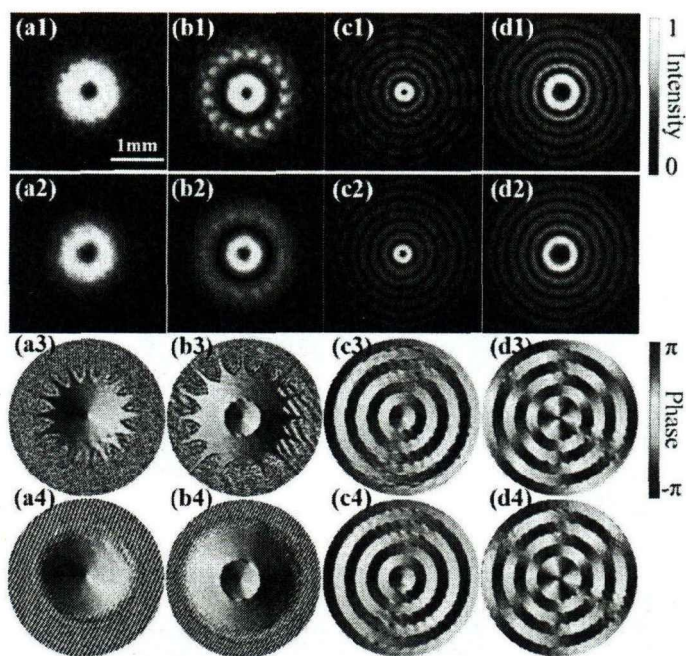


图 5-5 实验中生成的 OAM 光束。

(a1-d1) 分别为使用 Lee 方法生成  $LG_{10}$ 、 $LG_{11}$ 、贝塞尔 ( $l=1$ ) 与贝塞尔 ( $l=3$ ) 光束的强度分布，(a2-d2) 分别为使用优化后 Lee 方法生成 (a1-d1) 对应光束的强度分布，(a3-d3) 与 (a4-d4) 分别为两种方法生成对应光束的相位分布。

我们利用这两种方法还实验研究了不同的 LG 模式和贝塞尔模式，图 5-5 中展示了部分模式的实验结果。其中第一行是 Lee 方法产生的模式强度分布，第二行是优化的 Lee 方法得到的对应模式强度分布。第三和第四行分别为两种方法测量得到的对应光束相位分布。对比可见，优化的方法得到了更精确的振幅和相位分布。定量计算了生成光场的保真度：以贝塞尔模式为例，优化前后的保真度分别为 0.89 和 0.94。除了 OAM 本征模式，叠加模式也进行了实验研究：ANG 模式，生成的 ANG 光束的强度分布如图 5-6 (a) - (e) 所示。该 ANG 光束是由  $l \in [-3; 3]$  的相位涡旋光场叠加而成的，强度分布为一个扇形结构，

通过控制角参数  $j$  可以使光束产生一个旋转。

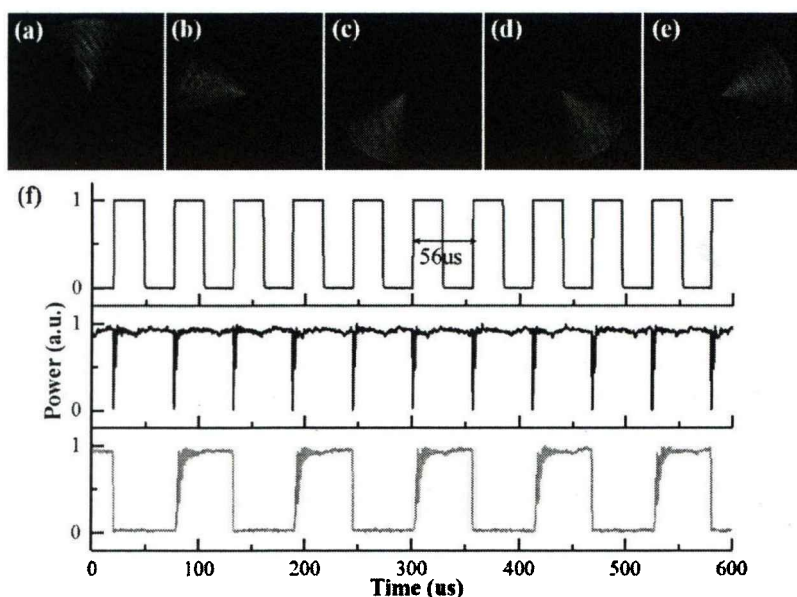


图 5-6 动态切换 ANG 光束的实验结果。

(a) - (e) 为动态切换 ANG 光束强度分布实验的结果，生成的 ANG 光束是由  $l \in [-3: 3]$  的相位涡旋光叠加而成的，ANG 光束中的  $j$  参数变化会使生成的光束产生一个旋转。(f) 为光场动态切换过程的测试结果。其中红线曲线为 DMD 输出的外触发信号曲线，蓝色曲线为光场模式切换的响应曲线，绿色曲线为光电探测器探测到的光场总光强曲线。可以看出最快的切换速度可达 17.86 kHz。

此外还展示了基于 DMD 的模式高速切换。为了测试 OAM 模式的切换速度，实验利用光电二极管(PDB420A, Thorlabs)和数据采集系统(NI PXIe5122, National Instruments)探测模式切换的强度波形。结果如图 5-6 (f) 所示，红线是 DMD 输出的触发信号，蓝色曲线则展示了 ANG 光束波前间的动态切换，切换速率可达 17.8 kHz。除了这里介绍的 OAM 模式与 OAM 叠加模式外，我们的方法还适用于其它复杂光束的整形，这种振幅和相位的动态调制是经典通信实现和 QKD 系统空间模式编码实现的重要技术。

### 5.1.5 基于 OAM 模式的信息编码

基于优化 Lee 方法实验生成了高质量的 OAM 光束，这里进一步开发其在光通信中的应用。OAM 本征模式之间是正交的，这使可以通过叠加的 OAM 光束来增加通信容量，即 OAM 复用技术。为演示 OAM 复用，采用叠加 OAM 光场的权重系数作为信息的载体。例如在 ASCII 协议中，一个字母可以用八个二进制数表示(即: 0 或 1)，因此具有 8 种拓扑荷的 OAM 光场进行多路复用就可以

编码字母表中的任何一个字母。基于这一原理，我们通过设计不同拓扑荷 OAM 光束的叠加来构造一个复杂光场，然后对复杂光场的测量与解码便可以得到想要的字母。图 5-7 (a) 展示了编码单词“ALP”的多路复用光场，对应的二进制代码如图 5-7 (c) 所示。

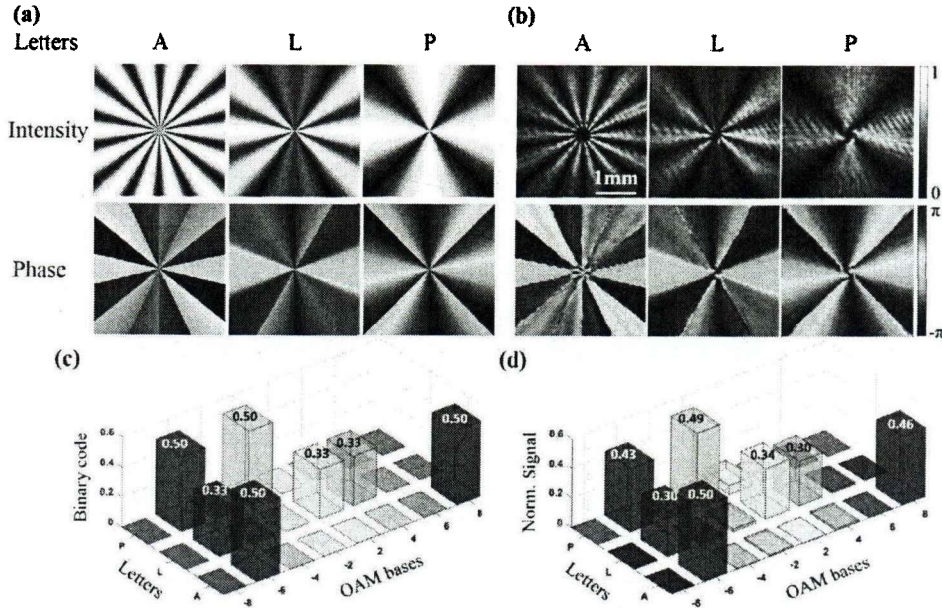


图 5-7 多路复用 OAM 光束进行信息编码实验结果。

图 (a) 为字母“ALP”多路复用信号的强度分布与相位分布。(b) 图为对于多路复用信号振幅与相位分布的测量结果，实验结果与 (a) 图中的理想分布相吻合。(c) “ALP”中的字母可以使用二进制的 ASCII 进行表示，每个字母包含 8 位(1 个字节)的信息。每个字节拥有相同的总振幅，即图中每个字母的信号条强度加起来为 1，振幅均匀地分布在多路复用信号的涡旋光束中，涡旋光束拓扑荷为从-8 到 8。(d) 实验测量了“ALP”中每个字母对应的多路复用信号，通过多路复用信号与某一个基矢之间的内积计算得到图中信号条的高度，作图时对信号条的高度进行了归一化处理。

借助于优化的 Lee 方法与 DMD 高保真度的光场生成与动态复杂光场切换得以实现，这为高速光通信提供了编码和传输的基础。

## 5.2 单像素相位成像

为进行细胞的相位成像，我们提出了一种复傅立叶频谱采样的单像素相位成像技术。该技术利用 DMD 复杂光场调制技术生成不同波矢的平面波照明物体，采用干涉和四步相移采集物体的傅里叶频谱，重构物体的复振幅透过率函数，实现对物体的振幅与相位同时成像。本小节介绍这种单像素相位成像的原理和实验结果。

### 5.2.1 单像素相位成像原理

根据傅里叶光学原理, 拥有复振幅的物体可以通过其傅里叶频谱进行重构, 如图 5-8 (a) 所示。

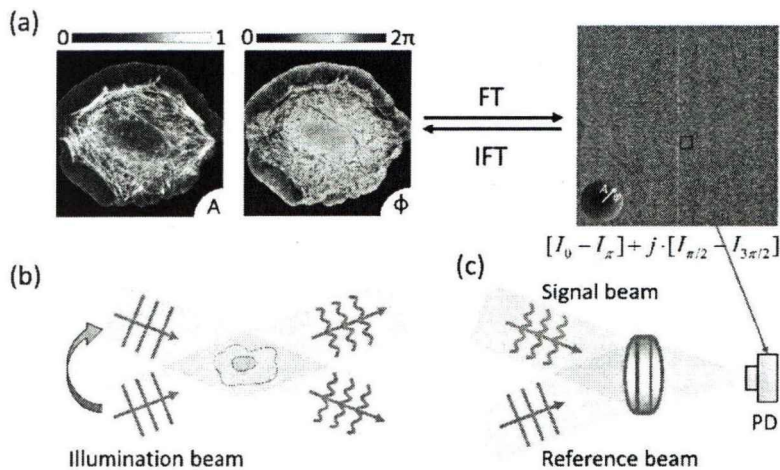


图 5-8 基于复频谱采样的单像素相位成像原理。

(a) 一个拥有复振幅的物体可以通过傅里叶变换得到其复频谱, 也可以通过复频谱重构物体的复振幅。(b) 为了得到复傅里叶频谱, 需要使用不同方向平面波进行扫描, 然后与一束参考平面波进行干涉。(c) 收集干涉后的光强, 再借助四步相移方法可以得到傅里叶频谱上的复系数。

假设物体被一束相干光源照明, 他的复透过率函数可以分解为一系列平面波的叠加:

$$O(x, y) = \sum g(k_x, k_y) P(x, y, k_x, k_y), \quad (4.9)$$

其中  $P(x, y, k_x, k_y) = \exp[-j(k_x x + k_y y)]$ , 代表着平面波的复振幅,  $(k_x, k_y)$  是平面波波矢的方向,  $g(k_x, k_y)$  是对应波矢在傅里叶频谱中的复系数。因此, 采样了傅里叶频谱中的复系数后, 对其逆傅里叶变换可重构物体信息:

$$O(x, y) = F^{-1} \{g(k_x, k_y)\}, \quad (4.10)$$

其中  $F^{-1}$  是逆傅里叶变换算符。

单像素探测方式重构相位需要采用干涉方案采样每个傅立叶系数。每次测量中, 干涉图样由经过物体的光与参考光干涉产生, 然后干涉场的总光强被收集, 如图 5-8 (c) 所示。考虑到光路中光强的损失与探测器的感光效率, 一般只能收集总光强的一部分, 即:



$$I(k_x, k_y, \varphi) \propto \iint |P(x, y, k_x, k_y)O(x, y)e^{j\varphi} + R(x, y)|^2 dx dy. \quad (4.11)$$

为采集傅里叶系数的实部与虚部，我们采用四步相移法。在每个复系数的测量中，照明平面波的初始相位分别为  $\varphi = 0, \pi/2, \pi, 3\pi/2$ ，通过四次测量得到的光强便可以计算出复系数：

$$\alpha g(k_x, k_y) = [I(k_x, k_y, 0) - I(k_x, k_y, \pi)] + j \left[ I(k_x, k_y, \frac{3\pi}{2}) - I(k_x, k_y, \frac{\pi}{2}) \right] \quad (4.12)$$

$$\propto 4 \iint P(x, y, k_x, k_y)O(x, y)R^*(x, y) dx dy,$$

其中  $\alpha$  是一个常数。通过在  $k$  空间中扫描照明光束，如图 5-8 (b) 所示，便可以采样傅里叶频谱中对应空间频率的复系数。在此基础上，利用快速傅里叶变换算法实现对物体的复振幅的重构。

### 5.2.2 单像素相位成像实验

单像素相位成像的实验装置如图 5-9 所示，它基于马赫-曾德尔干涉仪构建。实验光源是 633 nm 的氦氖激光器(Coherent, 31-2140-000)，激光扩束后分成两束：照明光束和参考光束。照明光束以  $24^\circ$  角入射 DMD 靶面，DMD 通过  $4-f$  系统和空间滤波器实现光场复振幅的调制。成像物体放置在  $4-f$  系统的后焦面，调制产生的照明光束通过物体后与参考光束发生干涉。光路中的聚光透镜用于收集光束，其光强被光电探测器 (Thorlabs, PDB420A) 探测。探测的光强信号由计算机控制的 14 位数据采集卡(DAQ, National Instruments, NI PXIe-5122) 采集并数字化。为了同步照明和采集，实验使用 DMD 外触发信号触发 DAQ 板卡进行数据采集。

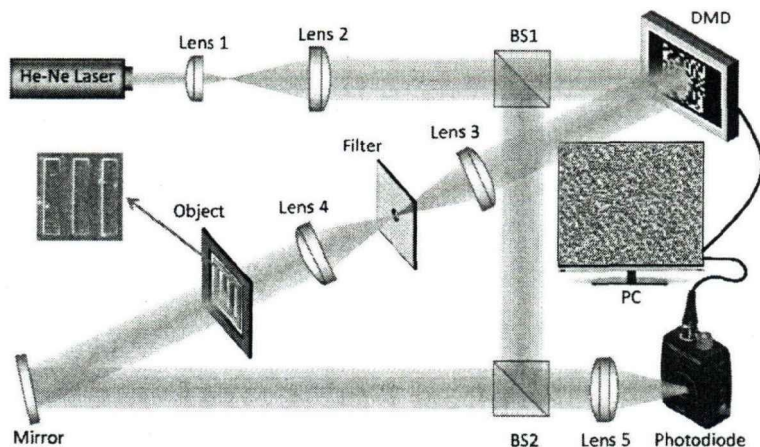


图 5-9 单像素相位成像实验装置图。

图中 BS 为分光棱镜, DMD 为数字微镜设备, PC 为电脑。

实验采用超像素方法编码光场, DMD 调制生成了一系列不同波矢的平面波, 对物体频谱进行采样。超像素方法将邻近像素的正方形区域(1080×1080 像素内的 4×4 像素)组成一个超像素, 经过超像素的一级衍射光束可以很好的调制复杂结构光场。利用该方法计算出所有平面波对应的二值化全息图, 并将其加载到 DMD 上进行频谱采样。在成像实验中, 我们实际上也使用了 DMD 来生成物体的相位分布, 因此, DMD 生成的光场包含有相位物体、平面波分布与 DMD 本身弯曲引起像差的像差修正。为了重构物体, 实验在 k 空间中采样了 81×81 个空间频率。对每个空间频率, 采用四步移相法得到复系数, 因此总共需要 26244 张全息图才能完成采样。由于 DMD 支持以 17.8 kHz 的速率进行光场切换, 因此仅用 1.47 秒就能完成采集。

### 5.2.3 单像素相位成像结果

为了验证成像原理, 我们测试了两个二值化相位分布且振幅均为常数的相位物体, 这两个物体也是由 DMD 生成的。一个是“USTC”标识, 另一个是相位标靶, 重构的图像如图 5-10 (a) 和 (c) 所示。两个二值化的相位物体被清晰成像。图 5-10 (b) 和 (d) 的曲线是它们的一维相位分布(沿着标有绿色箭头的线), 与理论曲线也非常接近。为了进一步量化成像质量, 我们计算了重构相位与理想相位分布的均方根误差 (RMSE)。RMSE 定义为  $RMSE = \sqrt{\sum_{j=1}^M \sum_{i=1}^N [I_{Exp}(i, j) - I_{Ideal}(i, j)]^2 / MN}$ , 其中  $M \times N$  是图像的像素分辨率。这两个测试相位物体的归一化 RMSE 分别为 0.12 和 0.14。虽然重构相位与原始相位存在一些偏差, 但相位分布得到了清晰的恢复。

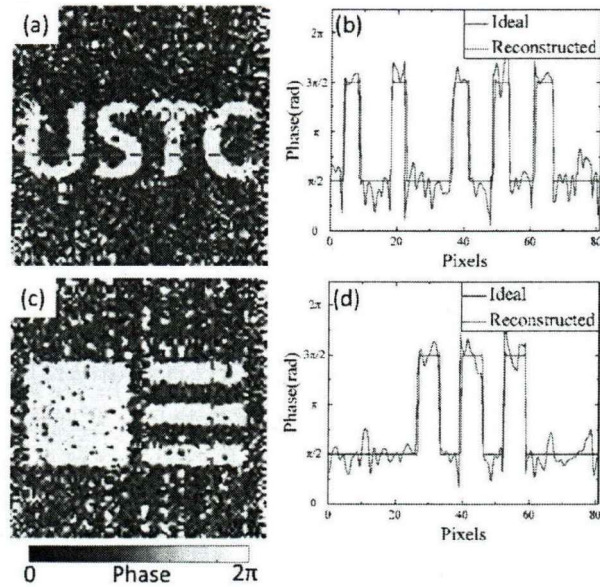


图 5-10 二值化相位物体的单像素相位成像实验结果。

(a) (c) 分别是对“USTC”标识与相位标靶相位分布的重构。(b) (d) 是沿着图 (a) (c) 中绿线的一维相位分布，图中红线为实验结果，蓝线为理想结果。

前面的实验使用了所有采集到的傅里叶频谱重构相位图像。由于采集时使用了四步相移法，成像需要 4 倍于像素数量的采集次数。这种采样方式限制了成像速度及其在动态场景中的应用，如流动细胞的成像。为了提高成像速度，我们引入了傅立叶频谱采样中的压缩感知策略。鉴于一般图像的频谱信息都集中在低频部分，我们使用了一个变密度随机欠采样，在低频采集更多的数据点，而高频采集数据较少，然后通过最小化被测图像的范数进行重构信息。本实验测试了二值化相位标识“USTC”，并对不同采样率下的成像性能进行了评价。图 5-11 (a) - (d) 显示了不同采样率下的重构图像。即使采样率低至 5%，重构物体也能辨认。采样率达到 20% 时，重构图像与全频谱重构图像性能相当。随着采样率的增加，图像变得越来越清晰，图 5-11 (e) 中 RMSE 变化也验证了这个趋势。压缩感知算法的引入显著加快了数据采集的过程，进而可以提高成像速度。

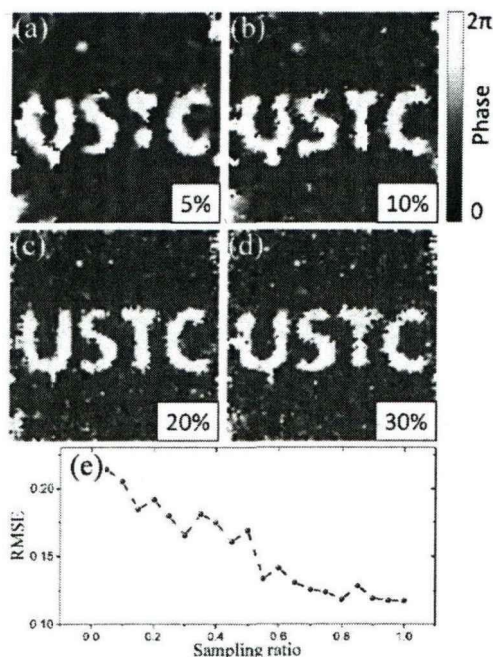


图 5-11 引入压缩感知的单像素相位成像结果。

图 (a) - (d) 分别对应采样率为 5%、10%、20%和 30%时的相位恢复结果。(e) 恢复图像与理想图像的 RMSE 值随采样率变化曲线。

此外，我们将单像素相位成像技术用于测量 OAM 光束的拓扑荷。我们直接对 OAM 光束的相位进行重构，图 5-12 展示了具有不同拓扑荷 OAM 光束的相位分布重构结果。根据重构得到的相位分布可以分辨出 OAM 光束的拓扑荷。单像素相位成像方法为测量 OAM 光束的拓扑荷提供了一种新的方法，这将有助经典和量子通信中的复用技术。

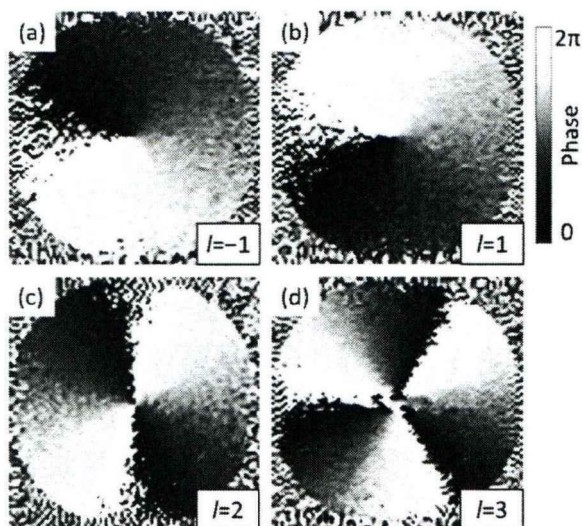


图 5-12 不同 OAM 光束相位分布成像结果。

图 (a) - (d) 中的 OAM 光束拓扑荷分别为  $l=-1, 1, 2, 3$ 。

### 5.3 本章小结

本章介绍了一种全新的单像素相位成像方法，该成像方法通过不同入射角度的平面波照明对物体图像进行傅里叶频谱采样。不同波矢的平面波生成依赖于复杂光场调制技术。为此，我们研究了 DMD 复振幅调制技术，提出使用误差扩散算法来优化 Lee 方法，提高光场调制的精度。此外，我们利用 DMD 的复杂光场调制技术实现了单像素相位成像，并成功重构出二值化相位样品的相位分布。为了进一步提高成像速度，我们引入压缩感知算法实现了亚奈奎斯特采样下的图像重构，证明了 20% 的采样数据便可得到较好的重构效果。最后，通过对 OAM 光束相位分布的成像，证明了该方法也能够成像连续的分布的相位型物体。值得注意的是，平面波具有非衍射特性，这种成像方法可以开发成拥有超长的景深 (depth of field, DOF) 的显微镜，减小物体离焦对成像造成的影响。考虑到相位成像对于界面的敏感特性与亚波长量级的探测灵敏度<sup>[131]</sup>，该方法有望在细胞成像或生物医学等领域发挥作用，如研究微流道中流动的细胞，这也是本章研究工作的主要目的。

## 第6章 总结与展望

### 6.1 论文总结

人类对于生命科学的研究正在从宏观走向微观，从现象走向机理，从唯象走向本质，这使得分子生物学研究在近些年成为了研究的热点，其中对生物大分子结构与功能的研究更是帮助人类认知世界与自己的重要环节。对生物大分子研究手段众多，单分子光镊也是其中之一。抱着解开生物大分子神秘面纱的使命感，我踏上了使用光镊研究生物大分子结构与功能的道路。博士期间主要开展有如下工作。

搭建了用于单分子研究的光镊，并对其进行不断的优化。探测光路的引入在保证较高的光阱刚度下，提高了光镊的探测精度；反馈补偿系统漂移使光镊拥有长时间的稳定性。用 DNA 过拉伸实验、粘滞系数测量实验与细胞标定实验验证了标定的正确性与系统的稳定性。针对研究的单分子课题，编写了系统自动化控制程序，提高实验效率的同时，降低人为因素对实验的影响，得到更精确、更稳定的实验结果。

重点利用光镊技术对 *rpoS* RNA 的自抑制茎环结构进行了研究。得到 RNA “力-伸展”曲线以及 *rpoS* RNA 自抑制茎环结构被打开的动力学过程，确认了它的 three-way-junction 结构。精细分析了 *rpoS* RNA 的每一条打开路径，计算了自抑制茎环结构打开所需自由能与核心部分的自由能，结果与 MFold 软件对自抑制茎环二级结构与自由能的预测吻合很好。实验发现镁离子明显提高了 RNA 核心部分的结构强度，由此推测镁离子会促使自抑制茎环结构变得更加紧密并改变茎环的空间取向。

本文还利用光镊实验研究了驱动蛋白-1 与 CENP-E 的动力学特性，发现 CENP-E 最快运动速度一般低于驱动蛋白-1 的最快运动速度。进一步研究了两种小分子抑制剂 GSK 与 Syntelin 对 CENP-E 的抑制机理。在加入 GSK 后，CENP-E 会与微管粘连在一起，由此推断 GSK 阻断了 ATP 水解为 ADP 的过程。在加入 Syntelin 后，CENP-E 在高负载力下的运动速度明显减慢，且 ATP 浓度对于 Syntelin 的抑制效果有显著影响，由此猜想 Syntelin 是在 CENP-E 行走过程中与其结合。

我们提出了一种利用复傅立叶频谱采样实现目标相位提取的单像素成像技

术。该技术利用 DMD 生成不同波矢的平面波，平面波透过物体后再与静止的参考光束进行干涉。使用透镜收集干涉后的光强并用单像素探测器进行测量，再结合四步相移技术便可以得到物体的复傅里叶频谱。将傅里叶逆变换应用于所得到的频谱，便可以重构物体的复振幅透过率函数，实现对物体的振幅与相位同时成像。

综上所述，本文建立了高精度，高稳定性的光镊研究生物单分子力学特性实验平台，并通过一系列生物物理交叉问题的研究证实了这一平台在生命科学领域的价值。研究取得的结果在生命科学基本问题、医学应用等方面都具有一定贡献，为使用光镊进行深入的分子生物学研究奠定了基础。

## 6.2 工作展望

本文中建立了三个单分子光镊研究体系，包括 RNA 结构研究、驱动蛋白行走研究与蛋白间相互作用研究。在 RNA 结构研究体系中，实验方法与数据处理方法已经建立，可以进一步研究 Hfq 蛋白与 sRNA 帮助解除自抑制的动态过程，也可以研究其他 RNA 的结构。在驱动蛋白行走研究体系中，可以研究不同抑制剂对 CENP-E 的抑制机理，也可以研究磷酸化等修饰对 CENP-E 的调控，还可以研究其它马达蛋白或者新兴的人造马达。在蛋白间相互作用研究体系中，可以研究不同蛋白间相互作用强度，也可以研究蛋白与 DNA 之间的相互作用，例如绪论中提到的 CENP-T-W-S-X 复合体对于 DNA 的打包。

## 参考文献

- [1] Ashkin A. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure [J]. Physical review letters, 1970, 24(4): 156.
- [2] Ashkin A, Dziedzic J M, Bjorkholm J, et al. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles [J]. Optics letters, 1986, 11(5): 288-90.
- [3] Ashkin A, Dziedzic J M, Yamane T. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams [J]. Nature, 1987, 330(6150): 769.
- [4] Liang H, Berns M W. Astral and spindle forces in PtK2 cells during anaphase B: a laser microbeam study [J]. Journal of Cell Science, 1993, 104(4): 1207-16.
- [5] Wang H, Liu X, Li Y, et al. Isolation of a single rice chromosome by optical micromanipulation [J]. Journal of Optics A: Pure and Applied Optics, 2003, 6(1): 89.
- [6] Ehrlicher A, Betz T, Stuhrmann B, et al. Guiding neuronal growth with light [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(25): 16024-8.
- [7] Zhong M-C, Wei X-B, Zhou J-H, et al. Trapping red blood cells in living animals using optical tweezers [J]. Nature communications, 2013, 4(1768).
- [8] Neuman K C, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy [J]. Nature methods, 2008, 5(6): 491.
- [9] Lang M J, Asbury C L, Shaevitz J W, et al. An automated two-dimensional optical force clamp for single molecule studies [J]. Biophysical journal, 2002, 83(1): 491-501.
- [10] Block S M, Goldstein L S, Schnapp B J. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers [J]. Nature, 1990, 348(6299): 348.
- [11] Svoboda K, Schmidt C F, Schnapp B J, et al. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry [J]. Nature, 1993, 365(6448): 721.
- [12] Neuman K C, Abbondanzieri E A, Landick R, et al. Ubiquitous transcriptional pausing is independent of RNA polymerase backtracking [J]. Cell, 2003, 115(4): 437-47.
- [13] Wen J-D, Lancaster L, Hodges C, et al. Following translation by single ribosomes one codon at a time [J]. Nature, 2008, 452(7187): 598.
- [14] Abbondanzieri E A, Greenleaf W J, Shaevitz J W, et al. Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase [J]. Nature, 2005, 438(7067): 460.
- [15] Herbert K M, La Porta A, Wong B J, et al. Sequence-resolved detection of pausing by single RNA polymerase molecules [J]. Cell, 2006, 125(6): 1083-94.
- [16] Shaevitz J W, Abbondanzieri E A, Landick R, et al. Backtracking by single RNA



- polymerase molecules observed at near-base-pair resolution [J]. *Nature*, 2003, 426(6967): 684.
- [17] Rock R S, Rice S E, Wells A L, et al. Myosin VI is a processive motor with a large step size [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(24): 13655-9.
- [18] Heller I, Hoekstra T P, King G A, et al. Optical tweezers analysis of DNA-protein complexes [J]. *Chemical reviews*, 2014, 114(6): 3087-119.
- [19] Dame R T, Noom M C, Wuite G J. Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation [J]. *Nature*, 2006, 444(7117): 387.
- [20] Brouwer I, Sitters G, Candelli A, et al. Sliding sleeves of XRCC4-XLF bridge DNA and connect fragments of broken DNA [J]. *Nature*, 2016, 535(7613): 566.
- [21] Soltani M, Lin J, Forties R A, et al. Nanophotonic trapping for precise manipulation of biomolecular arrays [J]. *Nature nanotechnology*, 2014, 9(6): 448.
- [22] Brouwer I, Moschetti T, Candelli A, et al. Two distinct conformational states define the interaction of human RAD51 - ATP with single - stranded DNA [J]. *The EMBO journal*, 2018, 37(7): e98162.
- [23] Shabestari M H, Meijering A, Roos W, et al. Recent advances in biological single-molecule applications of optical tweezers and fluorescence microscopy [M]. *Methods in enzymology*. Elsevier. 2017: 85-119.
- [24] Van Dijk M A, Kapitein L C, Van Mameren J, et al. Combining optical trapping and single-molecule fluorescence spectroscopy: enhanced photobleaching of fluorophores [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004, 108(20): 6479-84.
- [25] Ishii S, Kawai M, Ishiwata S I, et al. Estimation of actomyosin active force maintained by tropomyosin and troponin complex under vertical forces in the in vitro motility assay system [J]. *PloS one*, 2018, 13(2): e0192558.
- [26] Reinemann D N, Sturgill E G, Das D K, et al. Collective force regulation in anti-parallel microtubule gliding by dimeric Kif15 kinesin motors [J]. *Current Biology*, 2017, 27(18): 2810-20. e6.
- [27] Lin C-T, Ha T. Probing single helicase dynamics on long nucleic acids through fluorescence-force measurement [M]. *Optical Tweezers*. Springer. 2017: 295-316.
- [28] Kudalkar E M, Scarborough E A, Umbreit N T, et al. Regulation of outer kinetochore Ndc80 complex-based microtubule attachments by the central kinetochore Mis12/MIND complex [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(41): E5583-E9.
- [29] Ganim Z, Rief M. Mechanically switching single-molecule fluorescence of GFP by unfolding and refolding [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017,

- 114(42): 11052-6.
- [30] Whitley K D, Comstock M J, Chemla Y R. Ultrashort nucleic acid duplexes exhibit long wormlike chain behavior with force-dependent edge effects [J]. *Physical review letters*, 2018, 120(6): 068102.
- [31] Roy R, Hohng S, Ha T. A practical guide to single-molecule FRET [J]. *Nature methods*, 2008, 5(6): 507.
- [32] Hellenkamp B, Schmid S, Doroshenko O, et al. Precision and accuracy of single-molecule FRET measurements—a multi-laboratory benchmark study [J]. *Nature methods*, 2018, 15(9): 669.
- [33] Leblanc S, Kulkarni P, Weninger K. Single Molecule FRET: A powerful tool to study intrinsically disordered proteins [J]. *Biomolecules*, 2018, 8(4): 140.
- [34] Duesterberg V K, Fischer-Hwang I T, Perez C F, et al. Observation of long-range tertiary interactions during ligand binding by the TPP riboswitch aptamer [J]. *Elife*, 2015, 4(e12362).
- [35] Brenner M D, Zhou R, Conway D E, et al. Spider silk peptide is a compact, linear nanospring ideal for intracellular tension sensing [J]. *Nano letters*, 2016, 16(3): 2096-102.
- [36] Lee S, Hohng S. An optical trap combined with three-color FRET [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(49): 18260-3.
- [37] Whitley K, Comstock M, Chemla Y. High-resolution optical tweezers combined with single-molecule confocal microscopy [M]. *Methods in enzymology*. Elsevier. 2017: 137-69.
- [38] Comstock M J, Whitley K D, Jia H, et al. Direct observation of structure-function relationship in a nucleic acid-processing enzyme [J]. *Science*, 2015, 348(6232): 352-4.
- [39] Smith S B, Cui Y, Bustamante C. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules [J]. *Science*, 1996, 271(5250): 795-9.
- [40] Bryant Z, Stone M D, Gore J, et al. Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA [J]. *Nature*, 2003, 424(6946): 338.
- [41] Bustamante C, Smith S B, Liphardt J, et al. Single-molecule studies of DNA mechanics [J]. *Current opinion in structural biology*, 2000, 10(3): 279-85.
- [42] Wuite G J, Smith S B, Young M, et al. Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity [J]. *Nature*, 2000, 404(6773): 103.
- [43] Koch S J, Shundrovsky A, Jantzen B C, et al. Probing protein-DNA interactions by unzipping a single DNA double helix [J]. *Biophysical Journal*, 2002, 83(2): 1098-105.
- [44] Koch S J, Wang M D. Dynamic force spectroscopy of protein-DNA interactions by unzipping DNA [J]. *Physical review letters*, 2003, 91(2): 028103.
- [45] Bennink M L, Leuba S H, Leno G H, et al. Unfolding individual nucleosomes by stretching

- single chromatin fibers with optical tweezers [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2001, 8(7): 606.
- [46] Carrion-Vazquez M, Oberhauser A F, Fowler S B, et al. Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(7): 3694-9.
- [47] Collin D, Ritort F, Jarzynski C, et al. Verification of the Crooks fluctuation theorem and recovery of RNA folding free energies [J]. *Nature*, 2005, 437(7056): 231.
- [48] Wen J-D, Manosas M, Li P T, et al. Force unfolding kinetics of RNA using optical tweezers. I. Effects of experimental variables on measured results [J]. *Biophysical journal*, 2007, 92(9): 2996-3009.
- [49] Liphardt J, Onoa B, Smith S B, et al. Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force [J]. *Science*, 2001, 292(5517): 733-7.
- [50] Li P T, Viereggs J, Tinoco Jr I. How RNA unfolds and refolds [J]. *Annu Rev Biochem*, 2008, 77(77-100).
- [51] Wu Y-J, Wu C-H, Yeh A Y-C, et al. Folding a stable RNA pseudoknot through rearrangement of two hairpin structures [J]. *Nucleic acids research*, 2014, 42(7): 4505-15.
- [52] Savinov A, Perez C F, Block S M. Single-molecule studies of riboswitch folding [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2014, 1839(10): 1030-45.
- [53] Qu X, Wen J-D, Lancaster L, et al. The ribosome uses two active mechanisms to unwind messenger RNA during translation [J]. *Nature*, 2011, 475(7354): 118.
- [54] Battesti A, Majdalani N, Gottesman S. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli* [J]. *Annual review of microbiology*, 2011, 65(189-213).
- [55] Weber H, Polen T, Heuveling J, et al. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*:  $\sigma$ S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity [J]. *Journal of bacteriology*, 2005, 187(5): 1591-603.
- [56] Hengge-Aronis R. Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter  $\sigma$ S-selective? [J]. *Current opinion in microbiology*, 2002, 5(6): 591-5.
- [57] Peng Y, Curtis J E, Fang X, et al. Structural model of an mRNA in complex with the bacterial chaperone Hfq [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(48): 17134-9.
- [58] Soper T J, Woodson S A. The rpoS mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA [J]. *Rna*, 2008, 14(9): 1907-17.
- [59] Lease R A, Woodson S A. Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory

- RNA [J]. *Journal of molecular biology*, 2004, 344(5): 1211-23.
- [60] Vale R D, Reese T S, Sheetz M P. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility [J]. *Cell*, 1985, 42(1): 39-50.
- [61] Svoboda K, Block S M. Force and velocity measured for single kinesin molecules [J]. *Cell*, 1994, 77(5): 773-84.
- [62] Block S M, Asbury C L, Shaevitz J W, et al. Probing the kinesin reaction cycle with a 2D optical force clamp [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(5): 2351-6.
- [63] Schnitzer M J, Block S M. Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step [J]. *Nature*, 1997, 388(6640): 386.
- [64] Kaseda K, Higuchi H, Hirose K. Alternate fast and slow stepping of a heterodimeric kinesin molecule [J]. *Nature Cell Biology*, 2003, 5(12): 1079.
- [65] Asbury C L, Fehr A N, Block S M. Kinesin moves by an asymmetric hand-over-hand mechanism [J]. *Science*, 2003, 302(5653): 2130-4.
- [66] Yildiz A, Tomishige M, Vale R D, et al. Kinesin walks hand-over-hand [J]. *Science*, 2004, 303(5658): 676-8.
- [67] Hancock W O, Howard J. Kinesin's processivity results from mechanical and chemical coordination between the ATP hydrolysis cycles of the two motor domains [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(23): 13147-52.
- [68] Klumpp L M, Hoenger A, Gilbert S P. Kinesin's second step [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101(10): 3444-9.
- [69] Hancock W O, Howard J. Processivity of the motor protein kinesin requires two heads [J]. *The Journal of cell biology*, 1998, 140(6): 1395-405.
- [70] Rice S, Lin A W, Safer D, et al. A structural change in the kinesin motor protein that drives motility [J]. *Nature*, 1999, 402(6763): 778.
- [71] Gudimchuk N, Vitre B, Kim Y, et al. Kinetochores kinesin CENP-E is a processive bi-directional tracker of dynamic microtubule tips [J]. *Nature cell biology*, 2013, 15(9): 1079.
- [72] Sardar H S, Gilbert S P. Microtubule capture by mitotic kinesin centromere protein E (CENP-E) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(30): 24894-904.
- [73] 刘行, 姚雪彪. 细胞有丝分裂马达蛋白的化学生物学研究与展望 [J]. *科学通报*, 2014, 59(3025).
- [74] Li H, Derosier D J, Nicholson W V, et al. Microtubule structure at 8 Å resolution [J]. *Structure*, 2002, 10(10): 1317-28.

- [75] Downing K H, Nogales E. Tubulin and microtubule structure [J]. *Current opinion in cell biology*, 1998, 10(1): 16-22.
- [76] Guydosh N R, Block S M. Backsteps induced by nucleotide analogs suggest the front head of kinesin is gated by strain [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(21): 8054-9.
- [77] Uemura S, Kawaguchi K, Yajima J, et al. Kinesin-microtubule binding depends on both nucleotide state and loading direction [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(9): 5977-81.
- [78] Rath O, Kozielski F. Kinesins and cancer [J]. *Nature reviews cancer*, 2012, 12(8): 527.
- [79] Wood K W, Lad L, Luo L, et al. Antitumor activity of an allosteric inhibitor of centromere-associated protein-E [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(13): 5839-44.
- [80] Chung V, Heath E I, Schelman W R, et al. First-time-in-human study of GSK923295, a novel antimetabolic inhibitor of centromere-associated protein E (CENP-E), in patients with refractory cancer [J]. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2012, 69(3): 733-41.
- [81] Südhof T C, Rothman J E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins [J]. *Science*, 2009, 323(5913): 474-7.
- [82] Chen Y A, Scheller R H. SNARE-mediated membrane fusion [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2001, 2(2): 98.
- [83] Sutton R B, Fasshauer D, Jahn R, et al. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution [J]. *Nature*, 1998, 395(6700): 347.
- [84] Bao H, Das D, Courtney N A, et al. Dynamics and number of trans-SNARE complexes determine nascent fusion pore properties [J]. *Nature*, 2018, 554(7691): 260.
- [85] Gao Y, Zorman S, Gunderson G, et al. Single reconstituted neuronal SNARE complexes zipper in three distinct stages [J]. *Science*, 2012, 337(6100): 1340-3.
- [86] Zhang Y. Energetics, kinetics, and pathway of SNARE folding and assembly revealed by optical tweezers [J]. *Protein Science*, 2017, 26(7): 1252-65.
- [87] Zorman S, Rebane A A, Ma L, et al. Common intermediates and kinetics, but different energetics, in the assembly of SNARE proteins [J]. *Elife*, 2014, 3(e03348).
- [88] Ma L, Rebane A A, Yang G, et al. Munc18-1-regulated stage-wise SNARE assembly underlying synaptic exocytosis [J]. *Elife*, 2015, 4(e09580).
- [89] Suzuki A, Hori T, Nishino T, et al. Spindle microtubules generate tension-dependent changes in the distribution of inner kinetochore proteins [J]. *The Journal of cell biology*, 2011, 193(1): 125-40.

- [90] Hori T, Okada M, Maenaka K, et al. CENP-O class proteins form a stable complex and are required for proper kinetochore function [J]. *Molecular biology of the cell*, 2008, 19(3): 843-54.
- [91] Perpelescu M, Fukagawa T. The abcs of cenps [J]. *Chromosoma*, 2011, 120(5): 425.
- [92] Schleiffer A, Maier M, Litos G, et al. CENP-T proteins are conserved centromere receptors of the Ndc80 complex [J]. *Nature cell biology*, 2012, 14(6): 604.
- [93] Gascoigne K E, Takeuchi K, Suzuki A, et al. Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes [J]. *Cell*, 2011, 145(3): 410-22.
- [94] Nishino T, Takeuchi K, Gascoigne K E, et al. CENP-TWSX forms a unique centromeric chromatin structure with a histone-like fold [J]. *Cell*, 2012, 148(3): 487-501.
- [95] Fukagawa T, Earnshaw W C. The centromere: chromatin foundation for the kinetochore machinery [J]. *Developmental cell*, 2014, 30(5): 496-508.
- [96] Takeuchi K, Nishino T, Mayanagi K, et al. The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA [J]. *Nucleic acids research*, 2013, 42(3): 1644-55.
- [97] Furuyama T, Henikoff S. Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils [J]. *Cell*, 2009, 138(1): 104-13.
- [98] Khakimov R I, Henson B, Shin D, et al. Ghost imaging with atoms [J]. *Nature*, 2016, 540(7631): 100.
- [99] Pelliccia D, Rack A, Scheel M, et al. Experimental x-ray ghost imaging [J]. *Physical review letters*, 2016, 117(11): 113902.
- [100] Radwell N, Mitchell K J, Gibson G M, et al. Single-pixel infrared and visible microscope [J]. *Optica*, 2014, 1(5): 285-9.
- [101] Bromberg Y, Katz O, Silberberg Y. Ghost imaging with a single detector [J]. *Physical Review A*, 2009, 79(5): 053840.
- [102] Pittman T, Shih Y, Strekalov D, et al. Optical imaging by means of two-photon quantum entanglement [J]. *Physical Review A*, 1995, 52(5): R3429.
- [103] Gatti A, Brambilla E, Bache M, et al. Ghost imaging with thermal light: comparing entanglement and classical correlation [J]. *Physical review letters*, 2004, 93(9): 093602.
- [104] Cheng J. Ghost imaging through turbulent atmosphere [J]. *Optics express*, 2009, 17(10): 7916-21.
- [105] Meyers R E, Deacon K S, Shih Y. Turbulence-free ghost imaging [J]. *Applied Physics Letters*, 2011, 98(11): 111115.
- [106] Shapiro J H. Computational ghost imaging [J]. *Physical Review A*, 2008, 78(6): 061802.

- [107] Duarte M F, Davenport M A, Takhar D, et al. Single-pixel imaging via compressive sampling [J]. *IEEE signal processing magazine*, 2008, 25(2): 83-91.
- [108] Katz O, Bromberg Y, Silberberg Y. Compressive ghost imaging [J]. *Applied Physics Letters*, 2009, 95(13): 131110.
- [109] Lustig M, Donoho D, Pauly J M. Sparse MRI: The application of compressed sensing for rapid MR imaging [J]. *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 2007, 58(6): 1182-95.
- [110] Chan W L, Charan K, Takhar D, et al. A single-pixel terahertz imaging system based on compressed sensing [J]. *Applied Physics Letters*, 2008, 93(12): 121105.
- [111] Zhang Y, Edgar M P, Sun B, et al. 3D single-pixel video [J]. *Journal of Optics*, 2016, 18(3): 035203.
- [112] Sun B, Edgar M P, Bowman R, et al. 3D computational imaging with single-pixel detectors [J]. *Science*, 2013, 340(6134): 844-7.
- [113] Sun M-J, Edgar M P, Gibson G M, et al. Single-pixel three-dimensional imaging with time-based depth resolution [J]. *Nature communications*, 2016, 7(12010).
- [114] Ferri F, Magatti D, Lugiato L, et al. Differential ghost imaging [J]. *Physical review letters*, 2010, 104(25): 253603.
- [115] Bina M, Magatti D, Molteni M, et al. Backscattering differential ghost imaging in turbid media [J]. *Physical review letters*, 2013, 110(8): 083901.
- [116] Zhang Z, Ma X, Zhong J. Single-pixel imaging by means of Fourier spectrum acquisition [J]. *Nature communications*, 2015, 6(6225).
- [117] Welsh S S, Edgar M P, Bowman R, et al. Fast full-color computational imaging with single-pixel detectors [J]. *Optics express*, 2013, 21(20): 23068-74.
- [118] Bian L, Suo J, Situ G, et al. Multispectral imaging using a single bucket detector [J]. *Scientific reports*, 2016, 6(24752).
- [119] Gittes F, Schmidt C F. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers [J]. *Optics letters*, 1998, 23(1): 7-9.
- [120] Allersma M W, Gittes F, Stewart R J, et al. Two-dimensional tracking of ncd motility by back focal plane interferometry [J]. *Biophysical journal*, 1998, 74(2): 1074-85.
- [121] Pralle A, Prummer M, Florin E L, et al. Three - dimensional high - resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light [J]. *Microscopy research and technique*, 1999, 44(5): 378-86.
- [122] Tolić-Nørrelykke S F, Schäffer E, Howard J, et al. Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane [J]. *Review of scientific instruments*, 2006,

- 77(10): 103101.
- [123] Rohrbach A, Stelzer E H. Three-dimensional position detection of optically trapped dielectric particles [J]. *Journal of Applied Physics*, 2002, 91(8): 5474-88.
- [124] Nicholas M P, Rao L, Gennerich A. Covalent immobilization of microtubules on glass surfaces for molecular motor force measurements and other single-molecule assays [M]. *Mitosis*. Springer. 2014: 137-69.
- [125] Sun Y, Di W, Li Y, et al. Mg<sup>2+</sup> - Dependent High Mechanical Anisotropy of Three - Way - Junction pRNA as Revealed by Single - Molecule Force Spectroscopy [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(32): 9376-80.
- [126] Marko J, Siggia E. Statistical mechanics of supercoiled DNA [J]. *Physical Review E*, 1995, 52(3): 2912.
- [127] Crooks G E. Path-ensemble averages in systems driven far from equilibrium [J]. *Physical review E*, 2000, 61(3): 2361.
- [128] Junier I, Mossa A, Manosas M, et al. Recovery of free energy branches in single molecule experiments [J]. *Physical review letters*, 2009, 102(7): 070602.
- [129] Svoboda K, Block S M. Biological applications of optical forces [J]. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 1994, 23(1): 247-85.
- [130] Lee W-H. Binary computer-generated holograms [J]. *Applied Optics*, 1979, 18(21): 3661-9.
- [131] Marquet P, Rappaz B, Magistretti P J, et al. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy [J]. *Optics letters*, 2005, 30(5): 468-70.



## 致 谢

在我的博士生涯即将结束之际，我想在此向我的博士学位指导老师表达最崇高的谢意。他们是中国科学技术大学的郭光灿院士与李银妹教授，本论文的工作正是在他们的亲切关怀与悉心指导下才得以顺利完成的。在我博士期间，导师们严肃的科学态度，严谨的治学精神，深厚的理论功底，丰富的实践经验，精益求精的工作作风，诲人不倦的师道品格深深地感染和激励着我，也必将使我一生受用。感谢实验室龚雷老师与王浩威老师对我科研上的指导与生活上的帮助，你们就是我人生中导航的灯塔、指路的明灯，没有你们我的博士很难顺利毕业。

在此，我要特别感谢激光生物实验室各位老师与同学对我的支持与帮助，实验室融洽的工作氛围使我生活快乐、工作安心。感谢实验室的师兄周金华、钟敏成，薛国胜，刘伟伟。特别感谢教会我很多知识的李迪师兄，你的无私是我的宝贵财富。感谢赵倩博士，6年的互相鼓励、共同成长值得我们将友谊永久珍藏。这里还要感谢我的师弟师妹们，李宣令、余盼盼、刘易凡在我的工作中给予了很大的帮助。

感谢我父母为我博士生涯提供了坚强后盾，没有你们的支持我可能早就放弃读博了。感谢我的前女友周文颖，虽然没能走到一起，但你留给我的都是美丽的回忆。感谢我身边所有好朋友与帮助过我的人，没有你们，我的生活黯淡无光。感谢世界上所有善良的人们，是你们让我相信世间仍有真情在。

感谢博士期间我在科研上与生活中遇到的困难，你们使我成长变强。你们让我明白科研需脚踏实地的前进；你们让我明白科研也不是净土，远离不了人情的枷锁；你们让我明白“兼爱非攻”不过是理想的乌托邦，“老吾老以及人之老”才是思考的常态。挫折是人生最重要的经历，让我重塑雄心壮志。

最后，祝愿实验室越来越好；祝愿师长与同学们工作顺利、事事顺意；祝愿朋友们身体健康、生活幸福！

呼新尧  
2019年5月

## 博士期间发表的学术论文与其他研究成果

### 已发表论文:

- Xinyao Hu, Hao Zhang, Qian Zhao, Panpan Yu, Yinmei Li, and Lei Gong\*. Single-pixel phase imaging by Fourier spectrum sampling. *Applied Physics Letters* 114 (5), 051102 (2019).
- Xinyao Hu†, Qian Zhao†, Panpan Yu, Xuanling Li, Ziqiang Wang, Yinmei Li, and Lei Gong\*. Dynamic Shaping of Orbital-Angular-Momentum Beams for Information Encoding. *Optics Express*, 26, no. 2: 1796-808 (2018).
- Lei Gong†\*, Qian Zhao†, Hao Zhang, Xinyao Hu, Kun Huang\*, Jiamiao Yang and Yinmei Li\*. Optical Orbital-Angular-Momentum-Multiplexed Data Transmission through Scattering Media. *Light Science & Applications*, 8(1): 27 (2019).
- Qian Zhao, Ziqiang Wang, Xin-Yao Hu, Panpan Yu, Ruishan Chen, Yinmei Li and Lei Gong\*. 3D focusing through highly scattering media using PSF modulation. *Applied Physics Letters*, 113(19): 191104 (2018)
- Jin-Hua Zhou, Di Li, Xin-Yao Hu, Min-Cheng Zhong, Zi-Qiang Wang, Lei Gong, Wei-Wei Liu, and Yin-Mei Li, Calibrating oscillation response of a piezo-stage using optical tweezers. *Optics Express* 23 (19), 24108 (2015).

### 会议论文:

- Xinyao Hu, Qian Zhao, Panpan Yu, Xuanling Li, Ziqiang Wang, Yinmei Li, and Lei Gong\*, Dynamic shaping of orbital-angular-momentum beams with an optimized Lee method, in Optical Manipulation Conference, (International Society for Optics and Photonics, 2018), 107121O.

### 已授权专利:

- 李迪, 李银妹, 周金华, 呼新尧. 一种永久性液态微球样品室: ZL20142-591155.2.

- 李迪, 李银妹, 呼新尧, 等. 实时温控微型样品室: ZL201420591122.8。
- 李迪, 钱晋, 李银妹, 呼新尧. 一种显微镜内样品温控加热装置和显微镜: CN201621289391.4。

**待发表论文:**

- Haowei Wang<sup>†</sup>, Xinyao Hu<sup>†</sup>, Xuanling Li, Lingna Yang, Yilin Zhu, Yunyu Shi, Qingguo Gong, and Yinmei Li, Conformation and mechanical property of rpoS mRNA inhibitory stem studied by optical tweezers and X-rayscattering. **protein & cells.**